

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**JOÃO PAULO RODRIGUES MARTINS**

*Masgiter Scientiae*

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO*, ASPECTOS  
ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Neoregelia*  
*concentrica* (BROMELIACEAE)**

**São Mateus, ES**  
**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO*, ASPECTOS  
ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Neoregelia*  
*concentrica* (BROMELIACEAE)**

**JOÃO PAULO RODRIGUES MARTINS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt

**São Mateus, ES**  
**2012**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

M386p Martins, João Paulo Rodrigues, 1984-  
Propagação *in vitro* e *ex vitro*, aspectos anatômicos e fisiológicos de *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) / João Paulo Rodrigues Martins. – 2012.  
94 f. : il.

Orientador: Edilson Romais Schmildt.  
Coorientador: Rodrigo Sobreira Alexandre, Breno Régis Santos.  
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Anatomia vegetal. 2. Bromélia. 3. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura . 4. Morfogênese. I. Schmildt, Edilson Romais. II. Alexandre, Rodrigo Sobreira. III. Santos, Breno Régis. IV Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. V. Título.

CDU: 63

---

# **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO*, ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Neoregelia concentrica* (BROMELIACEAE)**

**JOÃO PAULO RODRIGUES MARTINS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada: 16/02/2012

---

Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Dr. Omar Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Universidade Federal de Alfenas  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientador)

**Dedico aos meus pais, irmãos, avós,  
sobrinha e amigos de Alfenas**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus caminhos.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Dr. Edilson Romais Schmildt pela atenção e confiança no desenvolvimento do projeto de mestrado.

Ao meu coorientador Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre pela atenção e colaboração significativa no desenvolvimento e redação da dissertação.

Ao meu coorientador Dr. Breno Régis Santos pelo apoio e ajuda.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical (PPGAT), Dr. Fábio Ribeiro Pires, pela atenção e dedicação aos mestrandos.

Ao professor e amigo Dr. Antelmo Ralph Falqueto pelos conselhos, atenção e contribuições no projeto.

Aos Sr. Dário Martins e Sr. Roberson Maia pelo material vegetal inicial.

À sempre prestativa e atenciosa secretária do PPGAT, Bernadeth Seixas.

Aos meus pais Gelim e Mercedes, irmãos Lucas e Marcos, sobrinha Maria Eduarda, avó Geni e avô Antônio (*in memoriam*) pelo apoio, amor e encorajamento.

À minha avó Maria Ana (*in memoriam*) pela dedicação, amor incondicional e principalmente, por ter sempre apostado em meu potencial.

Aos meus sempre valorosos amigos de Alfenas Cristiana, Flávia, Kellen, Lucas, Luiz, Marina, Rafaella, Samara, Vanessa e Wesley.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Laboratório de Anatomia Vegetal e ao prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro pela oportunidade de realização do trabalho de morfofisiologia.

À mestranda em Fisiologia Vegetal (UFLA), Marinês Ferreira Pires pela amizade e auxílio com o estudo de anatomia vegetal *in vitro*.

Às meninas da Biobergue pela hospedagem e amizade.

À doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas (UFLA), Thaís Furtado Nani pela simpatia e contribuições no estudo referente à anatomia vegetal.

À minha eterna Canarinho.

Ao meu coorientador da graduação, Dr. Sandro Barbosa, pelos ensinamentos que enaltecera minha vida acadêmica.

Às mestrandas em Agricultura Tropical (UFES), Gizele Magevski e Mariana Ferraço pelo enorme auxílio nas etapas de realização do projeto, pela amizade e pelos momentos de Alemão e Valda que fizeram toda diferença.

Aos meus amigos de apartamento Clodoaldo e Clemilton pela ajuda e paciência.

À Monize e Valdelita pela ajuda durante minha estada em São Mateus.

Aos meus companheiros de mestrado (1ª e 2ª turma), que de alguma forma contribuíram na minha formação e realização do projeto.

Aos meus amigos do BIOGEN, Alfenas, São Mateus, Divinópolis, Betim, Uruguaiana e todas as outras pessoas que fizeram a minha vida acadêmica mais feliz e agradável, registre-se aqui meu profundo agradecimento.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Aspectos botânicos gerais de Bromeliaceae.....	3
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	7
2.3. Morfoanatomia <i>in vitro</i> .....	9
3. CAPÍTULOS .....	11
3.1. Multiplicação e morfoanatomia <i>in vitro</i> de <i>Neoregelia concentrica</i> (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae) .....	12
Resumo .....	12
Abstract .....	13
Introdução.....	13
Material e Métodos .....	14
Multiplicação <i>in vitro</i> .....	15
Análise anatômica .....	16
Resultados e Discussão .....	17
Multiplicação <i>in vitro</i> .....	17
Análise anatômica .....	23
Conclusões .....	29
Referências Bibliográficas .....	29
3.2. Enraizamento <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de <i>Neoregelia concentrica</i> (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae).....	34
Resumo .....	34
Abstract .....	34
Introdução.....	35



Material e Métodos .....	36
Cultivo e multiplicação <i>in vitro</i> .....	36
Enraizamento <i>in vitro</i> .....	36
Enraizamento <i>ex vitro</i> .....	37
Resultados e Discussão .....	38
Conclusões .....	47
Referências Bibliográficas .....	48
 3.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> de <i>Neoregelia concentrica</i> durante a aclimatização em resposta ao nível de luz .....	52
Resumo .....	52
Abstract .....	53
Introdução.....	53
Material e Métodos .....	54
Cultivo <i>in vitro</i> .....	54
Condições de aclimatização .....	55
Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (O-J-I-P) e teste JIP .....	56
Análise de caracteres de crescimento .....	57
Análise estatística .....	57
Resultados e Discussão .....	57
Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (O-J-I-P) e teste JIP .....	57
Análise de caracteres de crescimento .....	68
Conclusões .....	71
Referências Bibliográficas .....	72
 4. CONCLUSÕES GERAIS.....	77
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## RESUMO

MARTINS, João Paulo Rodrigues; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2012; **Propagação *in vitro* e *ex vitro*, aspectos anatômicos e fisiológicos de *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae)**; Orientador: Edilson Romais Schmildt, Coorientador: Rodrigo Sobreira Alexandre e Breno Régis Santos.

A propagação *in vitro* pode contribuir na multiplicação de diversas espécies de interesse comercial, como as bromeliáceas. Contudo, as condições de cultivo *in vitro* podem induzir a formação de plantas com estruturas e tecidos pouco desenvolvidos que podem prejudicar o posterior estabelecimento *ex vitro*. Assim, objetivou-se desenvolver um protocolo de propagação da bromélia *Neoregelia concentrica*, levando em consideração aspectos anatômicos e fisiológicos. O primeiro experimento, referente à multiplicação, foi conduzido a partir de plantas de *N. concentrica* previamente estabelecidas *in vitro* e com 180 dias de idade. Essas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN) nos níveis 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu\text{M}$ . Aos 60 dias foram realizadas análises fitotécnicas e a coleta aleatória de três plantas de cada tratamento para a análise morfoanatômica. O segundo experimento, referente ao enraizamento, foi realizado por meio de dois métodos, *in vitro* e *ex vitro*. Na rizogênese *in vitro*, brotos multiplicados com 15,0  $\mu\text{M}$  de BAP foram cultivados por 60 dias em meio MS suplementado com ácido indol-3-butírico (AIB) ou ácido naftaleno-acético (ANA) nos níveis 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu\text{M}$ . Para rizogênese *ex vitro*, os brotos multiplicados com 15,0  $\mu\text{M}$  de BAP tiveram suas bases imersas por 60 minutos em solução de AIB ou ANA nos níveis 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu\text{M}$ . Após imersão, os brotos foram plantados em bandejas plásticas contendo vermiculita e cultivados por 45 dias. Ao final de cada método de rizogênese foi realizada a análise dos caracteres fitotécnicos. No terceiro experimento, referente à aclimatização, plantas de *N. concentrica* multiplicadas e enraizadas *in vitro* com 15,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,0  $\mu\text{M}$  de ANA, respectivamente, foram plantadas em bandejas plásticas contendo vermiculita e cultivadas sob os níveis de luz 30%, 50%, 70% e 100% por 28 dias. A análise da fluorescência da clorofila foi realizada a cada sete dias e a avaliação dos

caracteres fitotécnicos aos 28 dias de aclimatização. Na multiplicação *in vitro*, verificou-se que o aumento dos níveis de citocininas induziu maior emissão de brotos, além da formação de tecidos foliares internos mais espessos, sendo o emprego de BAP mais eficiente em relação a CIN. No segundo experimento, observou-se maior enraizamento *in vitro* (30 dias) e maior número de raízes nos brotos cultivados em meio com 3,0 µM de ANA, já na rizogênese *ex vitro*, observou-se maior número de raízes e com maior comprimento médio quando aplicado 5,0 µM de AIB. Na aclimatização, averiguou-se menor estresse nas plantas cultivadas com redução parcial do nível de luz, sendo indicado o nível de 50% devido à recuperação em menor tempo e maior crescimento de *N. concentrica*. Foi possível estabelecer um protocolo eficiente de propagação da bromélia *N. concentrica*.

Palavras-chave: anatomia vegetal, bromélia, cultura de tecidos, fluorescência da clorofila, organogênese direta

## ABSTRACT

Martins, João Paulo Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, February 2012; ***In vitro* and *ex vitro* propagation, anatomical and physiological aspects of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae)**; Advisor: Edilson Romais Schmildt, Co-advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre and Breno Regis Santos.

The spread *in vitro* may contribute to the multiplication of several species of commercial interest, as bromeliads. However, *in vitro* culture conditions can induce the formation of plants with poorly developed structures and tissues that can harm the subsequent *ex vitro* establishment. Thus, the objective was to develop a protocol for the propagation of bromeliad *Neoregelia concentrica*, taking into account anatomical and physiological aspects. The first experiment concerning the multiplication, was conducted from plants of *N. concentrica* previously established *in vitro* and with 180 days old. These were inoculated into test tubes containing MS medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (KIN) at 0.0; 5.0; 10.0 and 15.0  $\mu\text{M}$ . At 60 days were analyzed for agronomic parameters and random collection of three plants of each treatment for morphoanatomical analysis. The second experiment, referring to the rooting, was carried out by two methods, *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro* rooting, shoots multiplied with 15.0  $\mu\text{M}$  of BAP were cultured for 60 days on MS medium supplemented with indole-3-butyric acid (IBA) or naphthalene-acetic acid (NAA) at 0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0  $\mu\text{M}$ . For *ex vitro* rooting, shoots multiplied with 15.0  $\mu\text{M}$  of BAP had their bases immersed for 60 minutes in a solution of IBA or NAA at 0.0; 5.0; 10.0 and 15.0  $\mu\text{M}$ . After immersion, the shoots were planted in plastic trays containing vermiculite and grown for 45 days. At the end of each method of rooting analysis was performed character phytotechnical. In the third experiment, referring to the acclimatization, plants *N. concentrica* multiplied and rooted *in vitro* with 15.0  $\mu\text{M}$  of BAP and NAA 3.0  $\mu\text{M}$ , respectively, were planted in plastic trays containing vermiculite and grown under light levels 30%, 50%, 70% and 100% for 28 days. The analysis of fluorescence was performed every 7 days and the evaluation of characters phytotechnical at 28 days of acclimatization. *In vitro* multiplication, it was found that increased levels of cytokines induced higher emission

of shoots, and the formation of leaf tissues thicker, the use of BAP and more efficient with regard to the KIN. In the second experiment, we observed a higher rooting *in vitro* (30 days) and greater number of roots in shoots grown in medium containing 3.0  $\mu\text{M}$  NAA, already in *ex vitro* rooting, we observed a higher number of roots and with greater length mean when applied 5.0  $\mu\text{M}$  IBA. In the acclimatization, it was found less stress in plants grown under partial reduction of light level, highlighting the level of 50% due to recovery in less time and greater growth of *N. concentrica*. It was possible to establish an efficient protocol for the propagation of bromeliads *N. concentrica*.

Key-words: plant anatomy, bromeliad, tissue culture, chlorophyll fluorescence, direct organogenesis

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura é um campo em expansão no Brasil, oferecendo contribuições significativas no setor econômico agrário. As plantas ornamentais tropicais têm importante papel na diversificação da agricultura tropical e grande valorização no mercado internacional (SILVA et al., 2008a; ULISSES et al., 2010), principalmente de bromélias (Bromeliaceae), o que leva a acreditar no potencial brasileiro de se tornar um grande exportador dessas plantas (FERREIRA et al., 2007).

A Mata Atlântica apresenta grande riqueza em espécies da família Bromeliaceae, sendo muitas endêmicas (MARTINELLI et al., 2008). As bromélias têm grande efeito ornamental e são comumente cultivadas em vasos decorativos de interior e projetos paisagísticos, o que levou em muitos casos, ao extrativismo predatório em seu habitat natural e conseqüentemente ao risco de extinção de algumas espécies dessa família (RODRIGUES et al., 2007). Assim, o cultivo e multiplicação dessas plantas surgem como opção econômica e ecologicamente viável, contribuindo para a sua conservação e utilização para fins comerciais (SANTOS et al., 2005).

A multiplicação de diversas espécies nativas e de interesse econômico pode ser realizada por meio da propagação *in vitro*, um método que proporciona a formação de populações de plantas homogêneas e possibilita a produção de mudas com alta sanidade e vigor (SOUZA et al., 2007). Essa técnica de multiplicação *in vitro* pode ocorrer via organogênese direta, na qual ocorre a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal (NICOLI et al., 2008), sendo a concentração e o tipo de fitorregulador os fatores que mais influenciam na resposta organogênica (JESUS et al., 2010). Contudo, estudos anatômicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar estruturas e tecidos pouco desenvolvidos quando comparados com plantas, da mesma espécie, cultivadas em casa de vegetação (LOURO et al., 2003; APÓSTOLO et al., 2005).

Existem na literatura relatos sobre o cultivo *in vitro* de bromélias, como as do gênero *Vriesea* (SILVA et al., 2009), *Ananas* (CARVALHO et al., 2009) e *Dyckia* (POMPELLI & GUERRA, 2005), nos quais os autores trabalharam com a propagação *in vitro*, multiplicação e enraizamento *in vitro*, respectivamente. Todavia, existem poucos relatos relacionados à anatomia de órgãos vegetativos de plantas propagadas *in vitro* dessa família e como estas são afetadas pelos fitorreguladores nas condições de cultivo *in vitro* e o comportamento fisiológico.

Neste trabalho, buscou-se o desenvolvimento de um protocolo de propagação da bromélia *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith, realizando-se três experimentos. No primeiro experimento, o objetivo foi avaliar as características anatômicas na multiplicação *in vitro* em resposta a diferentes tipos e níveis de fitorreguladores. No segundo experimento, objetivou-se avaliar características morfológicas das plantas no enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. No último experimento, referente à aclimatização de plantas, o objetivo foi avaliar os aspectos fisiológicos em função do nível de luz.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Aspectos botânicos gerais de Bromeliaceae**

As bromeliáceas possuem cerca de 3086 espécies, distribuídas em 58 gêneros (LUTHER, 2006). São de origem quase exclusiva do continente americano e ocorrem basicamente em regiões tropicais e zonas subtropicais, com cerca de 50% das espécies conhecidas no Brasil. A grande maioria das espécies brasileiras crescem na Mata Atlântica, embora a família tenha se adaptado a uma grande variedade de ecossistemas que vão desde o úmido até o árido, com hábitos terrestres, rupícolas e epífitas (STRINGHETA et al., 2005; CEITA et al., 2008).

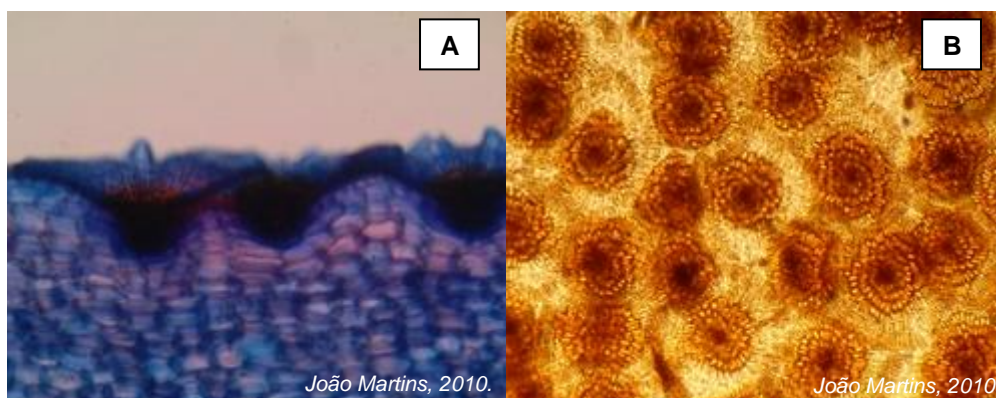
A família Bromeliaceae é dividida tradicionalmente em três subfamílias: Pitcairnioideae com espécies terrestres e sementes aladas dispersadas pelo vento; Tillandsioideae predominantemente epífitas com sementes plumosas e dispersadas pelo vento; e Bromelioideae terrestres e epífitas, com frutos carnosos e sementes dispersadas por animais (BENZING, 2000). Análises moleculares têm confirmado a monofilia de Bromelioideae e Tillandsioideae, mas apontam Pitcairnioideae como um grupo polifilético (HORRES et al., 2000; BARFUSS et al., 2005).

Essas plantas são ecologicamente importantes por serem fontes de frutos carnosos, néctar floral, água (acumulada entre as folhas) e abrigo para mamíferos, anfíbios, pássaros e insetos, principalmente as da subfamília Bromelioideae (BALKE et al., 2008).

As bromélias na sua estrutura geral consistem em um caule geralmente curto recoberto por folhas dispostas espiraladamente ao seu redor formando uma roseta. As folhas apresentam tricomas peltados na superfície (Figura 1), cuja principal função é a absorção de água e nutrientes. As margens foliares podem ser completamente lisas ou espinhosas e geralmente a região basal é mais alargada em relação à parte médio-apical, conhecida como bainha. Esta propicia a formação do tanque, vaso ou cisterna no centro da planta, com função de acumular água e detritos orgânicos. (LEME & MARIGO, 1993). As raízes das plantas epífitas



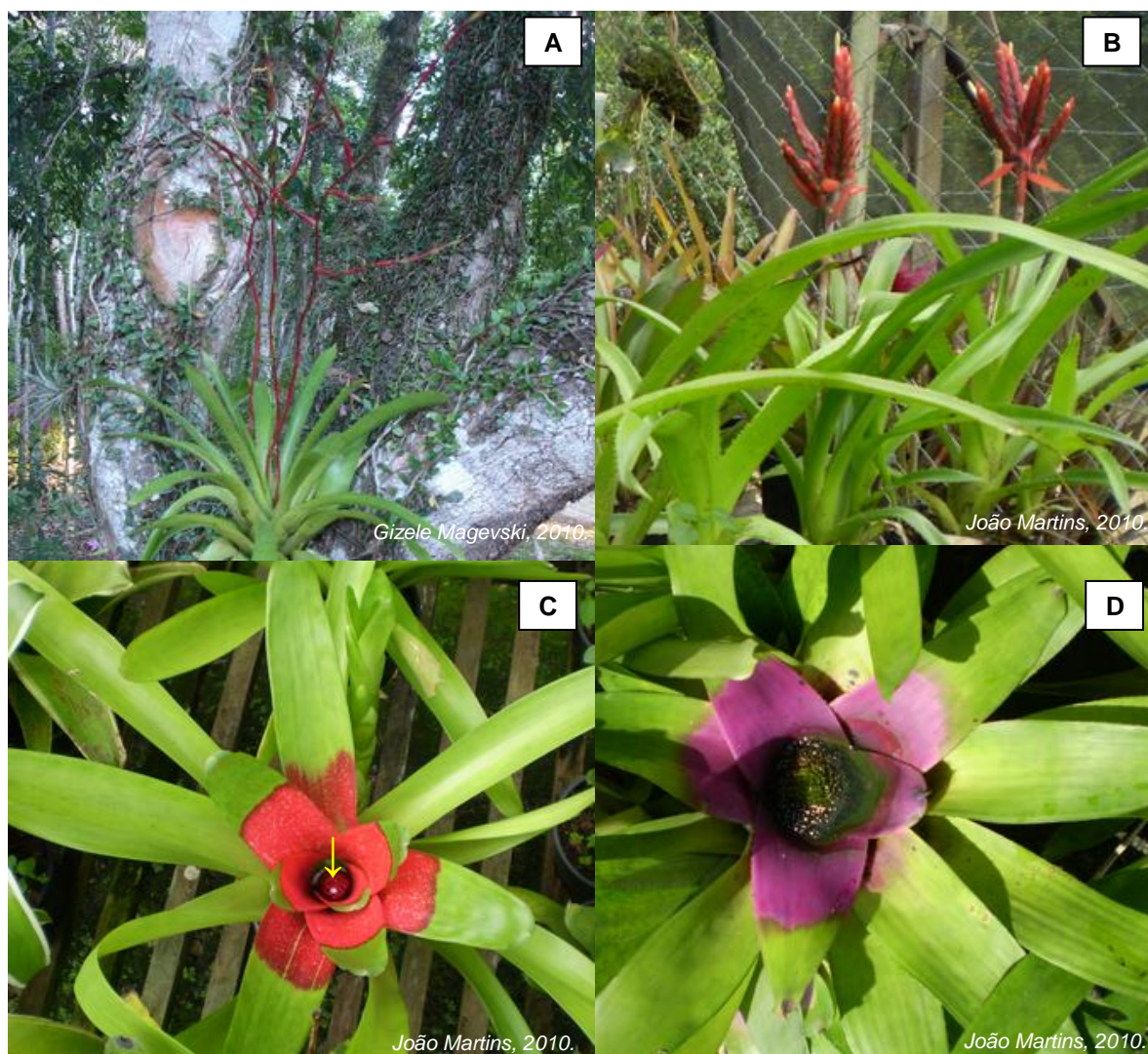
apresentam apenas função de fixação, quando na forma terrestre, as raízes são funcionais e permitem a fixação e a retirada de água e nutrientes do solo (CARVALHO & MERCIER, 2005).



**FIGURA 1.** Tricomas peltados de *Neoregelia concentrica* (Bromelioideae). (A) - Visão transversal; (B) - visão frontal.

No que se refere à anatomia foliar, em condições de campo, são descritas estruturas anatômicas características das bromeliáceas, tais como: presença de ceras, tricomas, epiderme uniestratificada revestida por cutícula, com diâmetro maior perpendicular ao eixo da folha e presença de hipoderme. O mesofilo apresenta tecido aquífero logo abaixo da face adaxial da epiderme, parênquima clorofilado ou não, onde estão os feixes vasculares, cordões de fibras isolados e canais de aeração (PITA & MENEZES, 2002; SCARANO et al., 2002; PROENÇA & SAJO, 2004; SEGECIN & SCATENA, 2004; SCATENA & SEGECIN, 2005; SOUSA et al., 2005; HORRES et al., 2007; VOLTOLINI & SANTOS, 2011).

Os gêneros de maior riqueza de espécies de bromélias são *Vriesea* (166 spp.), *Aechmea* (136 spp.) e *Neoregelia* (97 spp.) (MARTINELLI et al., 2008). As *Vriesea* (Tillandsioideae) apresentam roseta foliar aberta, folhas sem espinhos e inflorescência alongada com brácteas relativamente pequenas e bem distribuídas (Figura 2A). As espécies do gênero *Aechmea* e *Neoregelia* (Bromelioideae) possuem roseta foliar aberta e as margens foliares podem ter espinhos, porém distinguem-se entre si principalmente pelo fato de *Aechmea* possuir inflorescência alongada, com brácteas coloridas e com espinhos bem visíveis no ápice de cada sépala (Figura 2B), enquanto a *Neoregelia* apresenta inflorescência achatada e imersa na cisterna, sendo algumas espécies com as folhas centrais da roseta coloridas na época da floração (Figura 2C-D) (PAULA & SILVA, 2004).



**FIGURA 2.** Exemplares de Bromeliaceae. (A) – *Vriesea* sp; (B) – *Aechmea* sp; (C) – *Neoregelia compacta* (Mez) L.B.Sm, (seta) inflorescência; (D) – *Neoregelia concentrica* (Vell.) L.B.Sm. (Bromeliaceae: Bromelioideae)

As bromeliáceas são plantas que impressionam por suas formas exóticas e pela ampla gama de cores e variedade de suas flores e folhas. Possuem grande valor para arranjos e vasos de interior e ocupam sempre lugar de destaque em projetos paisagísticos (PAIVA et al., 2006). Por essa razão, a sua retirada dos ambientes naturais têm se intensificado nos últimos anos e vem colocando algumas espécies em ameaça de extinção (RODRIGUES et al., 2007). As bromélias dos gêneros *Alcantarea*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Guzmania*, *Aechmea*, *Neoregelia*, *Nidularium* e *Erystanthus* apresentam excelente aptidão ornamental e estão entre as plantas mais comercializadas (ANDRADE & DEMATTÊ, 1999).

Com a finalidade de conter a exploração depredatória, muitos estudos têm sido realizados visando à produção de mudas em larga escala, proporcionando



plantas ao mercado e reduzindo o extrativismo em ambientes naturais (RODRIGUES et al., 2007).

As bromélias são frequentemente propagadas por sementes (sexuada) ou por divisão de brotos laterais (assexuada), porém tais métodos convencionais não são apropriados para a produção massal requerida para as espécies ornamentais (CARNEIRO et al., 1999). A propagação vegetativa (Figura 3A) de bromélias é muito lenta, uma vez que poucos brotos laterais são produzidos por planta (PAIVA et al., 2006). Na reprodução por sementes (Figura 3B), as desvantagens estão relacionadas à produção limitada de mudas (DAQUITA et al., 1999), pois as taxas de germinação no ambiente natural, em geral, são baixas (MERCIER & KERBAUY, 1995).



**FIGURA 3.** Métodos propagativos convencionais de bromeliáceas. (A) – Propagação por emissão de brotos laterais; (B) – Propagação por sementes.

Outro possível problema relacionado à propagação sexuada de algumas bromélias é o demorado processo de maturação das sementes, que pode levar até um ano após a polinização (STRINGHETA et al., 2005). Além disso, existem espécies em que as sementes não germinam em condições *ex vitro*, como verificado em *Dyckia distachya* Hassler (POMPELLI & GUERRA, 2004) ou que possuem algum tipo de dormência, como é o caso de *Dyckia encholirioides* Mez. var. *encholirioides*, nas quais os tratamentos pré-germinativos são necessários para se otimizar a germinação (POMPELLI, 2006).

No que se refere à viabilidade das sementes, na maioria das bromélias, a perda é relativamente rápida quando armazenadas. Entretanto, as sementes de algumas espécies xerofíticas têm permanecido viáveis por mais de um ano, quando mantidas em laboratório sob condições adequadas de temperatura, umidade e

luminosidade para o armazenamento (MARTINELLI, 1994). Alguns exemplos são as sementes de *Billbergia elegans* Mart. ex Schult. & Schult.f. e *Neoregelia concentrica*, que permaneceram viáveis por até 72 e 76 semanas de armazenamento, respectivamente (BENZING, 2000). A espécie *Nidularium innocentii* Lem. apresenta sementes viáveis por um período de até aproximadamente 13 semanas quando armazenadas à 4°C (PEREIRA et al., 2010).

Santos et al. (2005) afirmaram que a forma de propagação mais utilizada pelos produtores da Região Metropolitana de Curitiba é a partir de sementes, na qual são necessários em média três anos até a planta estar pronta para ser comercializada, no caso das espécies mais comuns. Entre estas, pode-se citar algumas espécies dos gêneros *Aechmea* e *Neoregelia*. Já espécies como *Vriesea hieroglyphica* E. Morren e *Vriesea fosterii* L. B. Smith necessitam de um período entre 4,5 e 5 anos para atingirem o porte que o mercado exige. No caso das mudas provenientes de brotações laterais ou propagadas *in vitro*, o período de amadurecimento das mudas reduz-se para cerca 1 a 2,5 anos.

## 2.2. Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada em variedades que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala. Compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas com meio nutritivo artificial (PASQUAL, 2001). Entre as vantagens de sua utilização está a possibilidade de se obter várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano e da área necessária à propagação da espécie (ERIG & SCHUCH, 2005).

A utilização de sementes como explante inicial permite a manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais, auxiliando na conservação de várias espécies vegetais ameaçadas de extinção, como as de bromélias (POMPELLI & GUERRA, 2005; RECH FILHO et al., 2005). Silva et al. (2005) e Horbach et al. (2011) mencionam que plantas originadas de sementes ou embriões zigóticos possuem tecidos pouco diferenciados e alta capacidade de regeneração, o que possibilita uma ótima fonte de explantes.

A técnica de cultivo *in vitro* tem auxiliado a clonagem de genótipos superiores, além de acelerar os programas de melhoramento genético e colaborar

na preservação de espécies ameaçadas (NEHRA et al., 2005; BORGES et al., 2006). Essa técnica também tem sido utilizada na conservação *ex situ* de germoplasma vegetal (SANTOS, 2000).

A cultura de tecidos também pode auxiliar em inúmeras áreas da agricultura (CABRERA et al., 2003), como no setor agrário de flores e plantas ornamentais devido a elevada capacidade de produção de plantas com qualidade genética e fitossanitária em curto espaço de tempo, suprimindo assim a necessidade dos produtores na aquisição de mudas com qualidade comprovada (CARNEIRO et al., 1999).

Entre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação é uma das alternativas para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural ou quando os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE et al., 1991). Souza et al. (2010) afirmaram que essa técnica é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto.

Uma das principais etapas em um processo de micropropagação é a multiplicação dos brotos ou geração de propágulos, que pode ser realizada via organogênese direta (KITTO, 1997). Para este fim, geralmente são testados tipos e concentrações de citocininas, que comumente estão associados à quebra de dominância apical, além de estimularem a divisão celular e propiciar a indução de brotações (HOWELL et al., 2003). De acordo com Peres (2002) o efeito diferencial dos vários tipos de citocininas, quando aplicados ao meio de cultura, pode estar relacionado ao fato de cada uma delas interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno das plantas.

Após a obtenção das brotações *in vitro*, a formação do sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para sobrevivência e crescimento das plantas nas condições *ex vitro* (ROCHA et al., 2008).

A capacidade dos tecidos para formação de raízes depende de vários fatores endógenos e/ou exógenos e suas interações. O papel das auxinas na indução e no desenvolvimento de raízes tem sido bastante estudado, sendo as principais auxinas utilizadas: ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftaleno-acético (ANA) e ácido indol-3-acético (AIA) (LOPES et al., 2001; MACHADO et al., 2005), em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar. As concentrações mais frequentes estão na faixa de 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$  (GATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A última etapa da micropropagação, denominada aclimatização, consiste na transferência das plantas da condição *in vitro* para *ex vitro*. Essa transferência de um ambiente totalmente controlado, asséptico, rico em nutrientes e com elevada umidade, para um ambiente não controlado, séptico e com baixa umidade, pode ocasionar baixas taxas de crescimento (LAKSO et al., 1986) e alto índice de mortalidade das plantas, inviabilizando todas as etapas do cultivo *in vitro* (HAZARIKA, 2006).

Vários são os fatores que podem contribuir para um bom índice de sobrevivência das mudas propagadas *in vitro* e conseqüentemente, para o sucesso da aclimatização. Entre esses fatores, a luz, primordial para o crescimento das plantas, fornece sinais que regulam o desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2010). Dessa forma, modificações nos níveis de irradiância podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento (ATROCH et al., 2001).

### **2.3. Morfoanatomia *in vitro***

Plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar características peculiares como a baixa diferenciação dos tecidos foliares, devido à plasticidade fenotípica das mesmas, em detrimento a elevada umidade relativa e baixas trocas gasosas com o ambiente externo (MAJADA et al., 2000). Muitas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os vários estádios da propagação *in vitro* são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica das plantas (FIDELIS et al., 2000).

O problema da diferenciação celular dos tecidos também está relacionado com a baixa irradiância no ambiente *in vitro* (MAJADA et al., 2000), já que as salas de crescimento, geralmente, são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. Essa irradiância fornecida primariamente pode afetar o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas na formação dos tecidos do mesófilo e na ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando sua funcionalidade (REZENDE et al., 2008).

Outros problemas frequentes estão relacionados à menor quantidade de colênquima, esclerênquima e hiperidricidade. Esses por sua vez, estão

condicionados a quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultura, níveis elevados de reguladores de crescimento e baixa intensidade luminosa (MAJADA et al., 2000).

Oliveira et al. (2008) observaram que o tipo de citocinina pode influenciar a anatomia foliar de plantas cultivadas *in vitro* ao trabalharem com araticum-bravo (*Annona glabra* L.). Esses autores averiguaram que as plantas cultivadas na presença de tidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) apresentaram estômatos com maior diâmetro equatorial em relação às plantas submetidas aos tratamentos com zeatina (ZEA). Essa ainda proporcionou a maior densidade e o maior índice estomático, porém os estômatos apresentaram formato mais arredondado em relação às plantas submetidas aos reguladores TDZ, BAP e CIN, o que pode comprometer a funcionalidade estomática.

A pouca ou limitada funcionalidade dos estômatos das plantas cultivadas *in vitro* acarreta na baixa regulação à perda de água após a transferência para as condições *ex vitro* (LAMHAMED I et al., 2003), além das outras características anatômicas que podem ocorrer, como o reduzido desenvolvimento do mesofilo, especialmente os parênquimas clorofilianos e feixes vasculares (SANDOVAL et al., 1994; AMÂNCIO et al., 1999; GONÇALVES et al., 2000; ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO, 2003).

Com o conhecimento das alterações estruturais que ocorrem durante as etapas da propagação *in vitro* é possível controlar e aperfeiçoar as condições de cultivo *in vitro*, maximizando o estabelecimento destas plantas às condições *ex vitro* (APÓSTOLO & LLORENTE, 2000; CALVETE et al., 2002).

Existem na literatura estudos anatômicos relacionados ao comportamento de bromeliáceas *in vitro* do gênero *Ananas*, nas quais os autores avaliaram o método de cultivo em *A. erectifolius* L.B.Sm (PEREIRA et al., 2007) e as características das estruturas internas de folhas de *A. comosus* (L.) Merr., cultivar Pérola em condições *in vitro* e em casa de vegetação durante a aclimatização (BARBOZA et al., 2006).

### **3. CAPÍTULOS**



### 3.1. MULTIPLICAÇÃO E MORFOANATOMIA *IN VITRO* DE *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (BROMELIACEAE)

#### Resumo

As técnicas de cultura de tecidos podem contribuir na multiplicação de várias espécies de interesse comercial, como as bromeliáceas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito dos níveis e dos tipos de citocinina na multiplicação e na morfoanatomia da bromélia *Neoregelia concentrica*. Plantas de *N. concentrica* previamente estabelecidas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo de Murashige & Skoog suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN) nos níveis 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu\text{M}$ . Para as análises morfoanatômicas, três plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente aos 60 dias de cultivo e fixadas. Secções transversais foliares foram realizadas segundo procedimentos usuais em microtécnica vegetal. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (dois tipos de citocininas X quatro níveis). As avaliações morfoanatômicas foram realizadas após 60 dias de cultivo. Verificaram-se diferenças significativas em função dos tratamentos para todas as características avaliadas. O aumento do nível de citocinina induziu maior porcentagem de explantes com emissão de brotos e número médio de brotos, sendo o emprego de BAP com as maiores médias em relação à CIN. O aumento do nível de citocininas também induziu maior espessamento do parênquima aquífero e clorofiliano, tendo BAP valores superiores à CIN. O emprego de 15  $\mu\text{M}$  de BAP foi eficiente na multiplicação *in vitro* e no desenvolvimento dos tecidos foliares de *N. concentrica*.

Palavras-chave: anatomia vegetal, citocinina, cultura de tecidos, organogênese direta

## Abstract

The techniques of tissue culture can contribute to the multiplication of several interest commercial species, such as bromeliads. Thus, the objective was to evaluate the effect of level and type of cytokinin in the multiplication and morphoanatomy of bromeliad *Neoregelia concentrica*. Plants of *N. concentrica* previously established in vitro were inoculated in test tubes containing 10 mL of culture medium of Murashige & Skoog supplemented with levels 0,0; 5,0; 10,0 and 15,0  $\mu\text{M}$  of 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (KIN). For morphoanatomy analysis, 3 plants from each treatment were randomly collected at 60 days of culture and fixed. Leaf cross-sections were performed according to usual procedures in microtechniques. The experimental was completely randomized in a factorial scheme (2 types of cytokinin X 4 levels). Evaluations of characteristics morphoanatomy and phytotechnical were performed after 60 days of cultivation. There were significant differences in the treatments for all characteristics morphoanatomy and phytotechnical analyzed. The increase in level induced higher explants percentage with emission in shoots and average number of shoots, and the use of BAP with the highest average in relation to KIN. Increasing the level of cytokinins used in the culture medium also induced higher internal tissue thickening of leaf, and BAP values higher than KIN. The use of 15,0  $\mu\text{M}$  BAP is efficient for in vitro multiplication and development of leaf tissue of *N. concentrica*.

Key-words: plant anatomy, cytokinin, tissue culture, direct organogenesis

## Introdução

As bromélias são de origem quase exclusiva do continente americano e cerca de 50% das espécies conhecidas encontram-se no Brasil. A grande maioria das espécies brasileiras são endêmicas da Mata Atlântica (CEITA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009), um bioma ameaçado com aproximadamente 8% da área original preservada (MYERS et al., 2000).

Essas plantas apresentam importância ecológica por serem fontes de recursos para fauna silvestre, uma vez que servem como abrigo, possuem frutos carnosos, néctar e água (acumulada entre as folhas) (BALKE et al., 2008). As bromélias também apresentam valorização comercial como planta ornamental, devido à beleza de suas folhas e flores (VESCO et al., 2011). Por essa razão, a

coleta ilegal em ambientes naturais tem sido realizada com a finalidade de complementação de renda e vem colocando algumas espécies em ameaça de extinção (NEGRELLE et al., 2012).

Assim, a multiplicação de bromeliáceas surge como opção econômica e ecologicamente viável. Contudo, os métodos propagativos convencionais, por meio de sementes ou brotos laterais, não suprem a demanda do mercado crescente (CARNEIRO et al., 1999; SANTOS et al., 2005).

As técnicas de cultura de tecidos podem contribuir na multiplicação de diversas espécies de interesse, como as de bromeliáceas (GUERRA & VESCO, 2010). Entre os fatores que podem influenciar na propagação *in vitro*, o tipo e concentração de citocininas são os mais importantes (BHOJWANI & RAZDAN, 1996).

Trabalhos relacionados ao efeito de citocininas durante a propagação *in vitro* de bromélias já foram descritos por Galvanese et al. (2007) com *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, Oliveira et al. (2007) com *Ananas lucidus* Miller, Silva et al. (2008a) com *Dyckia maritima* Baker e Silveira et al. (2009) com *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez. Esses autores mostraram que a multiplicação *in vitro* pode ser empregada em algumas espécies desse grupo taxonômico.

Durante o cultivo *in vitro* muitas espécies podem apresentar características peculiares como a baixa diferenciação dos tecidos foliares (MAJADA et al., 2000) que podem induzir a deficiências fisiológicas e morte das plantas propagadas *in vitro* durante a fase de aclimatização (SWAIN et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos tipos e níveis de citocininas na multiplicação e na morfoanatomia da bromélia *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith, durante o cultivo *in vitro*.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro Universitário Norte do Espírito Santo (UFES – CEUNES) e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### Multiplicação *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro* de plantas, frutos de *Neoregelia concentrica* (Figura 1A) foram coletados de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação localizada no município de São Mateus/ES. As sementes (Figura 1B) foram extraídas mecanicamente dos frutos, seguida por lavagem em água para remoção da mucilagem e secagem em papel absorvente.



**FIGURA 1.** *Neoregelia concentrica* – (A) planta matriz (seta) região de coleta dos frutos; (B) sementes sem mucilagem antes da desinfestação.

As sementes foram submetidas à desinfestação com etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 1,0% (v/v) de cloro ativo por dez minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada para remoção do excesso da solução desinfestante e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da concentração original, suplementado com 58,439 mM de sacarose e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação dos explantes em câmara de fluxo laminar horizontal, o material foi mantido em sala de crescimento a 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos.

As plantas obtidas, com 180 dias de idade, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MS líquido estacionário suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 58,439 mM de sacarose e fitorreguladores 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN) nos níveis, em µM: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0. Os meios tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em

sala de crescimento a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo  $25,2\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  de fluxos de fótons fotossintéticos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (dois tipos de citocininas X quatro níveis), com quatro repetições, sendo cada parcela composta por cinco tubos de ensaio, totalizando 20 explantes por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de subcultivo e os caracteres fitotécnicos analisados foram: emissão de brotos (%), número médio de brotos e gemas, comprimento médio da maior folha (cm) (mensurado com régua milimetrada), massa da matéria fresca (mg) e seca (mg) das multibrotações (determinadas com auxílio de balança analítica). Para obtenção da matéria seca, o material vegetal foi previamente mantido em estufa de ventilação forçada a  $65^{\circ}\text{C}$  até a estabilização da massa. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e análise de regressão.

### **Análise anatômica**

Para as caracterizações anatômicas, três plantas de cada tratamento foram coletadas ao acaso e fixadas em solução de F.A.A. (formaldeído, ácido acético e etanol 50% na proporção de 0,5:0,5:9) por 48 horas, seguido de conservação em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

Secções transversais foram realizadas na região mediana da terceira folha completamente expandida a partir da região central da roseta com auxílio de micrótomo manual de mesa. Essas foram clarificadas com hipoclorito de sódio 3% (v/v) e posteriormente coradas com solução de azul de astra (0,1%) e safranina (1%), na proporção de 7:3 (BUKATSCH, 1972), sendo utilizada glicerina a 50% para montagem das lâminas.

As secções foram observadas em microscópio óptico acoplado à câmera digital para captura de imagens. As fotomicrografias foram utilizadas para as medições das características anatômicas usando o software UTHSCSA-Imagetool<sup>®</sup> calibrado com régua microscópica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (dois tipos de citocininas X quatro níveis) e composto de três repetições por tratamento. As espessuras das características anatômicas analisadas foram: face

adaxial e abaxial da epiderme ( $\mu\text{m}$ ), parênquima aquífero ( $\mu\text{m}$ ), parênquima clorofiliano ( $\mu\text{m}$ ) e mesofilo ( $\mu\text{m}$ ).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e análise de regressão.

## Resultados e Discussão

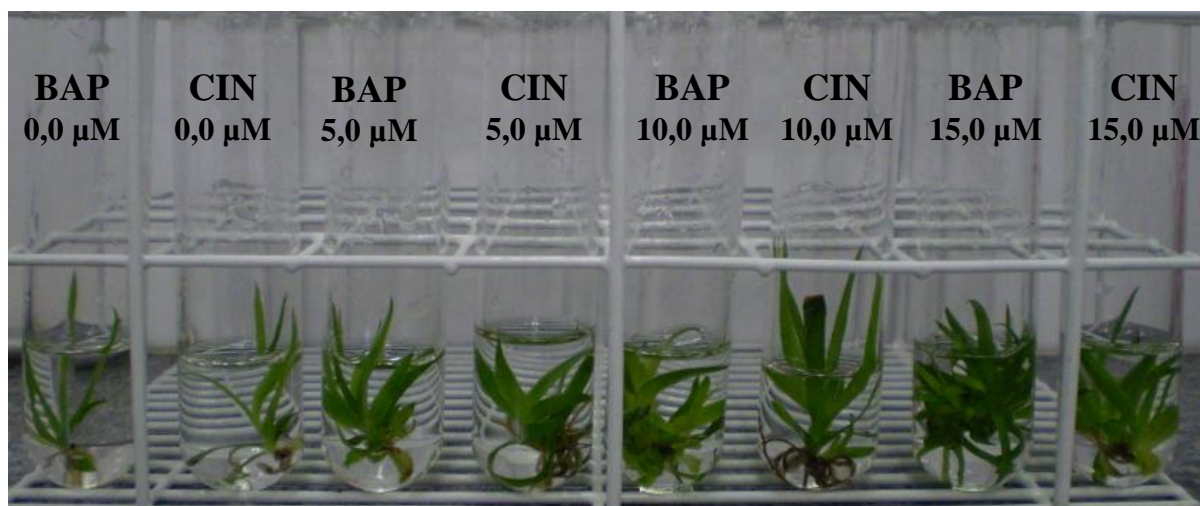
### Multiplicação *in vitro*

Por meio da análise de variância, verificaram-se diferenças significativas em função dos tratamentos para todos os caracteres fitotécnicos analisados, sendo a interação dos fatores (tipos de citocininas e níveis) significativa para a emissão de brotos (%), número médio de brotos e massa seca aos 60 dias de subcultivo de *Neoregelia concentrica* (Tabela 1 e Figura 2).

**TABELA 1.** Resumo da análise de variância para os caracteres fitotécnicos de *Neoregelia concentrica* aos 60 dias de subcultivo em meios com diferentes níveis e tipos de citocininas (CITOC)

Fontes de Variação	Quadrado médio					
	EB	NB	NG	CF	MF	MS
CITOC	10034,5**	49,3**	111,7*	1,4*	5807,7 <sup>ns</sup>	19,2 <sup>ns</sup>
NÍVEL	4688,5**	17,7**	57,4*	0,4 <sup>ns</sup>	17146,5*	55,6**
CITOC x NÍVEL	2546,5**	12,0**	28,0 <sup>ns</sup>	0,5 <sup>ns</sup>	6407,1 <sup>ns</sup>	31,5*
ERRO	107,1	0,21	17,9	0,2	5434,5	8,6
Média Geral	41,77	2,28	11,25	2,70	245,26	10,52
C.V. (%)	24,7	20,5	37,5	17,2	30,06	27,93

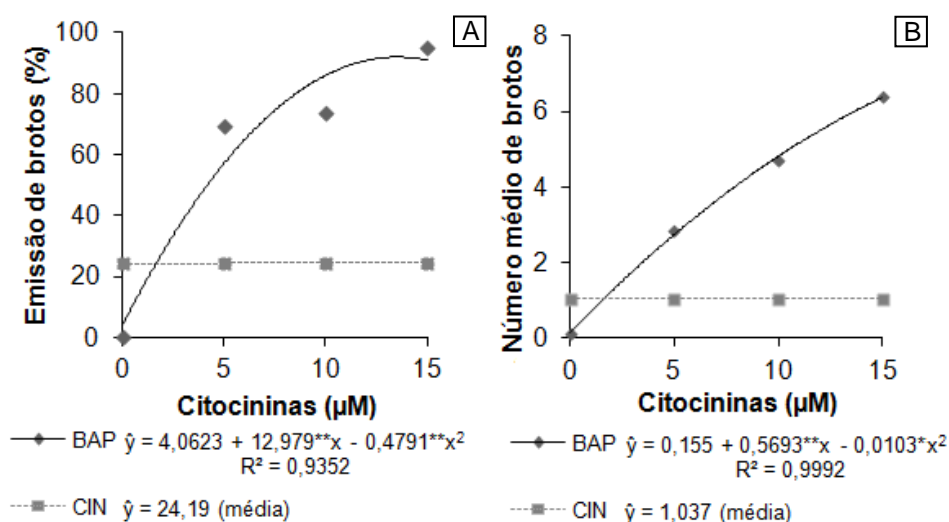
<sup>ns</sup> Não significativo a 5% pelo teste F; \*, \*\* Significativo a 5% e 1%, respectivamente pelo teste F. Emissão de brotos (%) (EB), número médio de brotos (NB), número médio de gemas (NG), comprimento médio da maior folha (CF), massa fresca (MF), massa seca (MS).



**FIGURA 2.** Aspectos visuais dos explantes de *Neoregelia concentrica* aos 60 dias de subcultivo em meios com diferentes tipos e níveis de citocininas.

As citocininas são indispensáveis na proliferação de gemas axilares, sendo os tipos e níveis os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009).

Para emissão (%) e número de brotos verificou-se comportamento quadrático com o aumento dos níveis de BAP, diferente da CIN que não apresentou ajuste significativo na curva (Figura 3A e B).



**FIGURA 3.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na (A) emissão de brotos e (B) número médio de brotos em explantes de *Neoregelia concentrica* (\*, \*\* Coeficiente significativo a 5% e 1%, respectivamente pelo teste t).

Resultados semelhantes para emissão de brotos (%) e número médio de brotos também foram observados dentro de cada nível dos fitorreguladores. Esses apresentaram controles (ausência dos fitorreguladores) estatisticamente iguais,

sendo os demais níveis do regulador BAP com valores superiores aos obtidos com CIN (Tabela 2).

**TABELA 2.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na emissão de brotos (%) e número médio de brotos de *Neoregelia concentrica* subcultivada *in vitro* por 60 dias

Níveis ( $\mu$ M)	Emissão de brotos (%)*		Número médio de brotos*	
	BAP	CIN	BAP	CIN
0,0	15,00 a	2,00 a	0,125 a	0,500 a
5,0	69,16 a	33,75 b	2,833 a	1,450 b
10,0	73,75 a	15,00 b	4,725 a	0,900 b
15,0	95,00 a	32,50 b	6,400 a	1,300 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si para cada característica analisada segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Silva et al. (2009) e Silveira et al. (2009) verificaram maior número de brotos nas bromélias *Vriesea scalaris* E. Morren e *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez respectivamente, quando empregaram BAP nos meios de cultivo em relação à CIN, semelhante ao verificado em *N. concentrica*.

Neste estudo, os resultados obtidos podem ser atribuídos ao maior efeito citocinínico do BAP em relação ao CIN. As citocininas estão associadas à quebra de dominância apical e no estímulo da divisão celular o que propicia a indução de brotações (BHOJWANI & RAZDAN, 1996; HOWELL et al., 2003). Nesse grupo de fitorreguladores, o tipo de citocinina pode interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno de cada espécie, obtendo assim respostas diferenciadas (PERES, 2002).

Os baixos índices de multiplicação *in vitro* de *N. concentrica* nos meios que empregaram CIN podem estar relacionados à atividade de sistemas enzimáticos na clivagem do grupo furfuril. Um exemplo é a citocinina oxidase que cataliza a degradação de citocininas, inibindo ou diminuindo a resposta organogênica (BARRUETO CID, 2005).

O BAP tem sido mais utilizado do que a CIN por ser um composto mais ativo e com custo razoável, além da CIN, uma adenilcitocinina, somente potencializar sua atividade na presença de uma auxina (KRIKORIAN, 1991).

O número médio de gemas foi influenciado tanto pelos tipos de citocininas, quanto pelos níveis destas, porém atuaram de forma independente. As plantas cultivadas em meio suplementado com BAP apresentaram número médio de gemas superior quando comparadas às plantas cultivadas com CIN (Tabela 3).

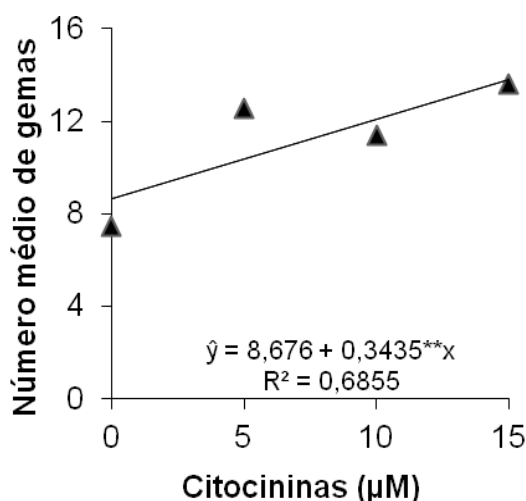


**TABELA 3.** Influência dos tipos de citocininas no número médio de gemas em *Neoregelia concentrica* aos 60 dias de subcultivo *in vitro*

Citocininas	Número médio de gemas*
BAP	13,121 a
CIN	9,384 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliado o efeito dos níveis de citocininas no número médio de gemas, este apresentou comportamento linear com o aumento dos níveis, independente do tipo de citocinina utilizada (Figura 4).



**FIGURA 4.** Número médio de gemas em função dos níveis de citocininas em *Neoregelia concentrica* durante o cultivo *in vitro* (\*\* Coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

As citocininas participam ativamente do controle da diferenciação celular e por isso estão intimamente envolvidas no processo de formação de gemas nas plantas (WERNER et al., 2001). Essa análise se faz importante, pois a partir do número de gemas por broto em função do tempo pode-se determinar a taxa de multiplicação e assim conduzir experimentos que visem obter maior número de mudas em tempo reduzido (ERIG & SCHUCH, 2005).

O comprimento médio da maior folha foi superior nas plantas cultivadas com CIN independente dos níveis (Tabela 4).

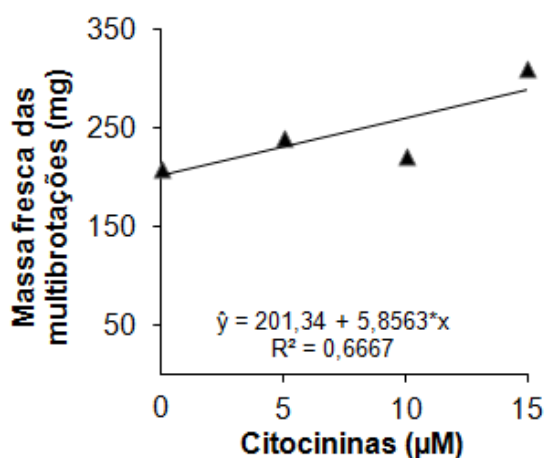
**TABELA 4.** Influência dos tipos de citocininas no comprimento médio da maior folha em *Neoregelia concentrica* aos 60 dias de subcultivo *in vitro*

Citocininas	Comprimento médio da maior folha (cm)*
BAP	2,485 b
CIN	2,911 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O uso de BAP pode apresentar efeito fitotóxico, que é caracterizado principalmente pela falta de alongamento, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós e engrossamento exagerado dos caules (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Essa redução de tamanho da parte aérea é comumente observada, porque o BAP é um regulador que induz à divisão celular reduzindo o tamanho das células e aumentando o número destas (PEREIRA et al., 2000).

A massa fresca das multibrotações teve comportamento linear com o aumento dos níveis das citocininas, independente do seu tipo (Figura 5).



**FIGURA 5.** Massa fresca das multibrotações de *Neoregelia concentrica* subcultivada por 60 dias em função dos níveis de citocininas (\* Coeficiente significativo a 5% pelo teste t).

Paqual et al. (2008) observaram incremento da massa fresca das multibrotações de abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *erectifolius* L.B.Sm.) com aumento dos níveis de BAP no meio de cultivo. O uso de citocininas estimulou maior produção da parte aérea por meio do aumento da massa fresca das multibrotações, número de brotos e folhas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

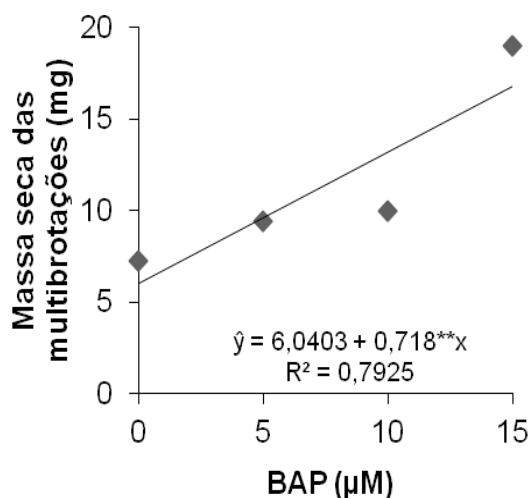
A massa seca das multibrotações apresentou interação dos fatores. A maior média foi averiguada quando empregado de 15,0  $\mu\text{M}$  de BAP, os demais níveis foram semelhantes entre si para as citocininas utilizadas (Tabela 5).

**TABELA 5.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na massa seca das multibrotações de *Neoregelia concentrica* subcultivada *in vitro* por 60 dias

Níveis ( $\mu\text{M}$ )	Massa seca das multibrotações (mg)*	
	BAP	CIN
0,0	7,2 a	7,6 a
5,0	9,4 a	10,7 a
10,0	10,0 a	9,7 a
15,0	19,0 a	10,4 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliado os níveis para massa seca das multibrotações, apenas as plantas subcultivadas com BAP foram diferentes entre si, apresentando comportamento linear com o aumento do nível (Figura 6), indicando assim o maior estímulo a proliferação celular com esse tipo de citocinina.



**FIGURA 6.** Massa seca das multibrotações de *Neoregelia concentrica* em função dos níveis de BAP (\*\* Coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

O uso de BAP tem sido eficaz para promover a multiplicação da parte aérea em diversas espécies (FRÁGUAS et al., 2009). Isso se deve principalmente por induzir a divisão celular com células de tamanho reduzido (PEREIRA et al., 2000), o que propicia a formação de uma maior massa seca.

### Análise anatômica

Neste trabalho, nas condições de cultivo, as folhas de *Neoregelia concentrica* em secção transversal, apresentaram epiderme uniestratificada, parênquima aquífero formado por células aclorofiladas de paredes delgadas, parênquima clorofiliano com células isodiamétricas, feixes vasculares colaterais, estes geralmente com feixes maiores em alternância com os menores e circundados por fibras. O mesofilo da espécie possui organização dorsiventral (Figura 7).

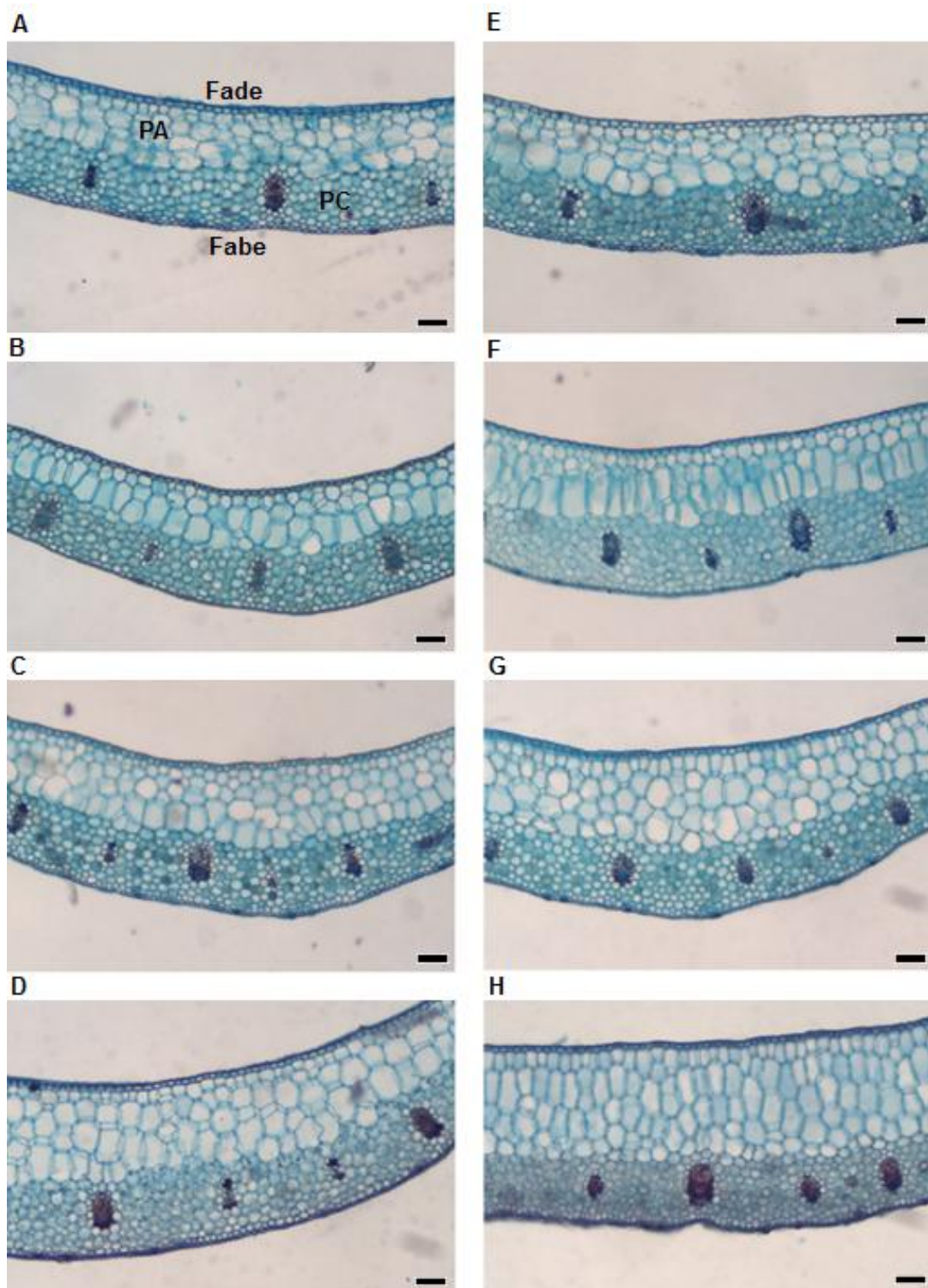
As características anatômicas analisadas apresentaram diferenças significativas de acordo com a análise de variância em função dos tratamentos empregados (Tabela 6).

**TABELA 6.** Resumo da análise de variância para as características anatômicas de folhas de *Neoregelia concentrica* aos 60 dias de subcultivo em meios com diferentes níveis e tipos de citocinina (CITOC)

Fontes de Variação	Quadrado médio				
	Fade	Fabe	PA	PC	ME
CITOC	0,084 <sup>ns</sup>	0,114 <sup>ns</sup>	31303,7**	12920,1**	84535,8**
NÍVEL	27,866**	9,442**	10131,6**	7826,2**	29167,4**
CITOC x NÍVEL	1,043 <sup>ns</sup>	0,277 <sup>ns</sup>	3649,4**	1513,8 <sup>ns</sup>	9473,4**
ERRO	4,813	0,613	488,7	503,3	1325,8
Média Geral	11,27	8,24	162,44	135,45	299,37
C.V. (%)	19,47	9,5	13,61	16,56	12,16

<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F. \*\* Significativo ao nível de 1% pelo teste F. Face adaxial da epiderme (Fade), face abaxial da epiderme (Fabe), parênquima aquífero (PA), parênquima clorofiliano (PC), mesofilo (ME).

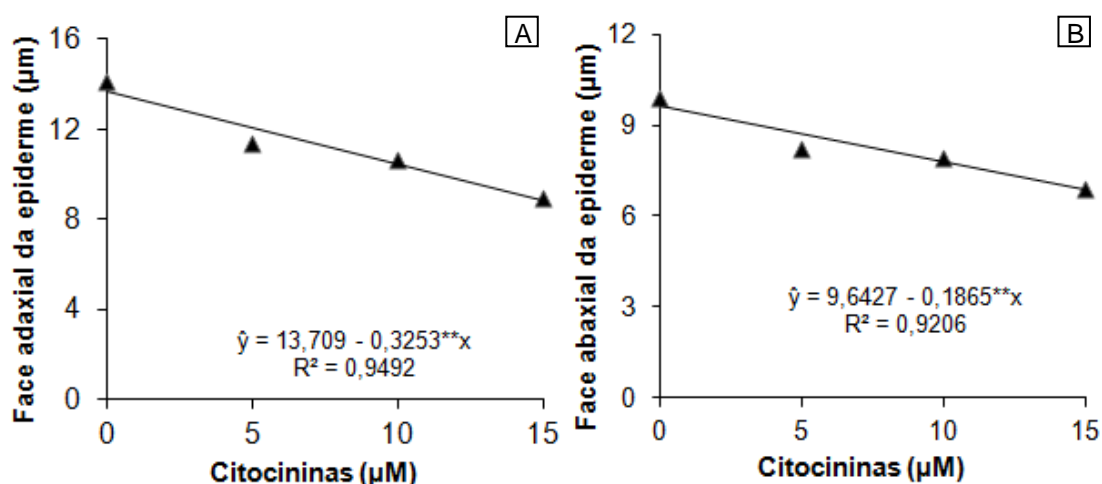
O tipo de citocinina utilizado durante a multiplicação *in vitro* pode influenciar no desenvolvimento dos tecidos foliares, induzindo respostas diferenciadas que podem comprometer a sobrevivência das plantas propagadas *in vitro* na fase de aclimatização (NAMLI & AYAZ, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).



**FIGURA 7.** Secções foliares de *Neoregelia concentrica* após 60 dias de subcultivo em meios com diferentes níveis e tipos de citocinina. A - 0,0  $\mu$ M de CIN; B - 5,0  $\mu$ M de CIN; C - 10,0  $\mu$ M de CIN; D - 15,0  $\mu$ M de CIN; E - 0,0  $\mu$ M de BAP; F - 5,0  $\mu$ M de BAP; G - 10,0  $\mu$ M de BAP; H - 10,0  $\mu$ M de BAP. Face adaxial da epiderme (Fade), face abaxial da epiderme (Fabe), parênquima aquífero (PA), parênquima clorofiliano (PC). Barra = 100  $\mu$ m.

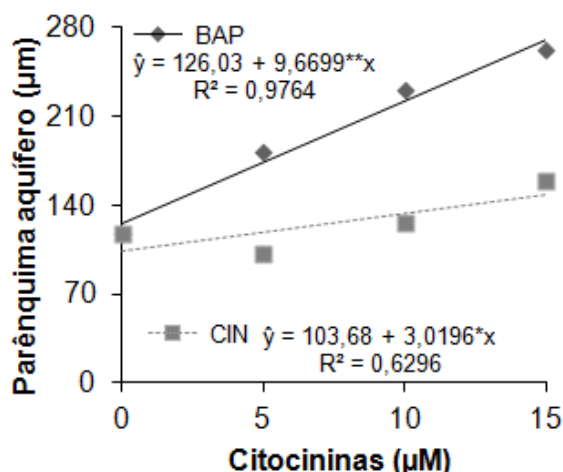
Entre os tratamentos de multiplicação *in vitro*, apenas os níveis de citocininas influenciaram na espessura da epiderme independentemente do tipo empregado. As espessuras da face adaxial e abaxial da epiderme apresentaram comportamento linear negativo com o aumento desses níveis (Figura 7 e 8). O uso das citocininas no meio de cultivo pode induzir à produção de células de tamanho reduzido durante a divisão celular (PEREIRA et al., 2000), o que pode explicar a redução da espessura da epiderme nos meios de cultivo que utilizaram citocinina exógena em relação ao controle.

A epiderme está relacionada à proteção mecânica e a restrição da perda de água da parte aérea (CARVALHO & PIRES, 2008), sendo vantajosa a maior espessura desse tecido, pois permite o desenvolvimento de uma barreira para a transpiração (CASTRO et al., 2009). Assim, o aumento do nível de citocinina na suplementação no meio de cultivo poderia dificultar o estabelecimento das plantas de *N. concentrica* micropropagadas durante a aclimatização.



**FIGURA 8.** Efeito dos níveis de citocininas na (A) face adaxial e (B) face abaxial da epiderme foliar de *Neoregelia concentrica* subcultivada por 60 dias (\*\* Coeficiente significativo a 1% segundo teste t).

A espessura do parênquima aquífero apresentou interação significativa entre os níveis e os tipos de citocininas, sendo o comportamento linear positivo com o aumento do nível em ambas citocininas (Figura 9).



**FIGURA 9.** Efeito dos tipos de citocininas na espessura do parênquima aquífero em folhas de *Neoregelia concentrica* durante o cultivo *in vitro* (\* coeficiente significativo a 5% pelo teste t).

Dentro de cada nível, apenas os controles foram semelhantes, nos demais tratamentos as plantas cultivadas nos meios suplementados com BAP apresentaram resultados superiores aos observados com CIN (Tabela 7).

**TABELA 7.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na espessura do parênquima aquífero em folhas de *Neoregelia concentrica* subcultivada *in vitro* por 60 dias

Níveis (µM)	Parênquima aquífero (µm)*	
	BAP	CIN
0,0	118,01 a	117,77 a
5,0	182,35 a	101,12 b
10,0	231,55 a	126,88 b
15,0	262,54 a	159,52 b

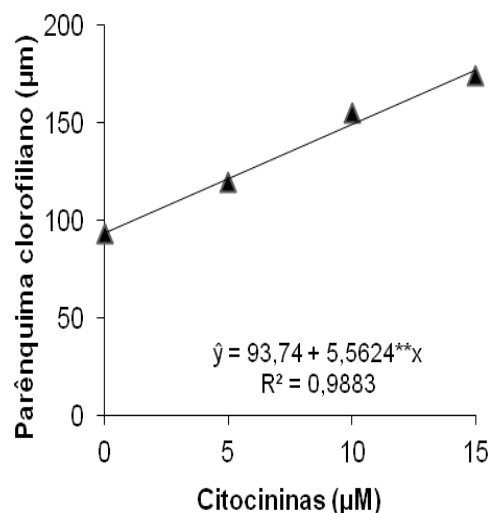
\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O parênquima aquífero é responsável pelo armazenamento de água no mesófilo, sendo uma estrutura adaptativa das bromeliáceas a ambientes xéricos (SILVA et al., 2008b). De acordo com Brighigna et al. (1984), esse tecido ao armazenar a água, protege a região clorofiliana da intensa luminosidade, além de favorecer o processo fotossintético.

O parênquima aquífero pode assumir grande importância no momento da aclimatização, impedindo a desidratação das plantas micropropagadas nos primeiros dias após o plantio, contribuindo assim, para a obtenção de altos índices de

sobrevivência (BARBOZA et al., 2006). Desta forma, o emprego de 15  $\mu\text{M}$  de BAP seria favorável na multiplicação *in vitro* da bromélia em estudo.

A espessura do parênquima clorofiliano foi influenciada pelos níveis e tipos de citocininas, porém estes fatores atuam independentemente. O espessamento desse tecido apresentou comportamento linear com o aumento dos níveis de citocinina adicionada no meio de cultivo (Figura 7 e 10).



**FIGURA 10.** Espessura do parênquima clorofiliano em função dos níveis de citocininas em *Neoregelia concentrica* durante o cultivo *in vitro* (\*\* Coeficiente significativo a 1% segundo teste t).

Para essa variável, o maior espessamento foi obtido quando se empregou BAP nos meios de cultivo em relação aos que utilizaram CIN (Tabela 8).

**TABELA 8.** Espessura do parênquima clorofiliano em função dos tipos de citocininas em folhas de *Neoregelia concentrica*

Citocinina	Parênquima clorofiliano ( $\mu\text{m}$ )*
BAP	158,66 a
CIN	112,26 b

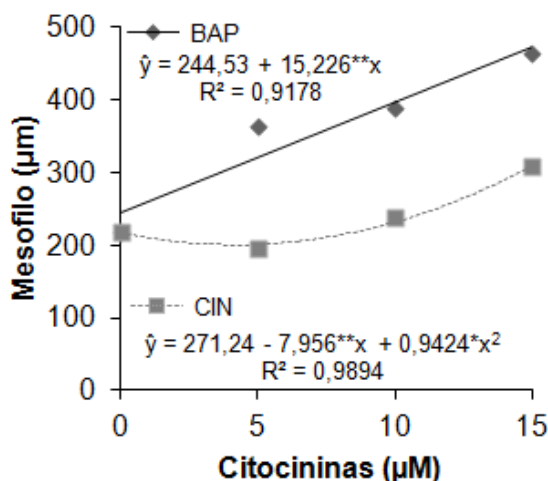
\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O parênquima clorofiliano é o tecido responsável pela fotossíntese, sendo fundamental o espessamento por permitir maior fixação de  $\text{CO}_2$  contribuindo na autotrofia das plantas após a transferência para o ambiente *ex vitro* (SILVA et al., 2008b; CASTRO et al., 2009).



Segundo Dutra et al. (2009) o cultivo *in vitro* convencional preconiza a adição de altas concentrações de sacarose ao meio de cultura e baixa irradiância. Esses fatores podem induzir alterações anatômicas que dificultam a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico que podem ocasionar em grande parte, perdas durante a aclimatização (KOZAI & KUBOTA, 2001; ARIGITA et al., 2002; DIGNART et al., 2009), o que faz do emprego de 15 µM de BAP potencialmente importante no espessamento do parênquima clorofiliano e possivelmente maior eficiência fotossintética nas folhas de *Neoregelia concentrica* micropropagadas.

Verificou-se interação dos níveis e os tipos de citocininas na espessura do mesofilo. O comportamento averiguado para os fitorreguladores foi o linear para BAP e quadrático para CIN com o aumento do nível (Figura 11).



**FIGURA 11.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na espessura do mesofilo de *Neoregelia concentrica* durante o cultivo *in vitro* (\*, \*\* Coeficiente significativo a 5% e 1%, respectivamente, segundo teste t).

As médias da espessura do mesofilo observadas com BAP foram superiores em relação às obtidas com CIN (Tabela 9).

**TABELA 9.** Efeito dos tipos e níveis de citocininas na espessura do mesofilo de *Neoregelia concentrica*

Níveis (µM)	Mesofilo (µm)*	
	BAP	CIN
0,0	219,17 a	220,11 a
5,0	363,14 a	195,21 b
10,0	387,91 a	237,72 b
15,0	464,67 a	308,00 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto maior a espessura do mesofilo, maior a eficiência fotossintética (ARAUJO et al., 2009). Como um dos principais problemas para as plantas propagadas *in vitro* está relacionado às baixas taxas de fotossíntese durante a aclimatização, a suplementação exógena de 15  $\mu\text{M}$  de BAP pode auxiliar no estabelecimento *ex vitro* e posteriormente no crescimento e desenvolvimento de *Neoregelia concentrica*.

### Conclusões

O tipo de citocinina influencia na resposta organogênica e na anatomia foliar de *Neoregelia concentrica*, sendo indicado o uso de BAP na suplementação do meio de cultivo.

O emprego de 15  $\mu\text{M}$  de BAP foi eficiente na propagação *in vitro* e no desenvolvimento dos tecidos foliares em *Neoregelia concentrica*.

O uso de CIN não é indicado para multiplicar *in vitro* a espécie *Neoregelia concentrica*.

### Referências Bibliográficas

- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y.; CASTRO, E.M.; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2506-2511, 2009.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of  $\text{CO}_2$  and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.115, n.1, p.166-173, 2002.
- BALKE, M.; GOMEZ-ZURITA, J.; RIBERA, I.; VILORIA, A.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; GARCIA, M.; HENDRICH, L.; VOGLER, A.P. Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the neotropical forest canopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.17, p.6356-6361, 2008.
- BARBOZA, S.B.S.C.B.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.185-194, 2006.
- BARRUETO CID, L.P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p.188.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**, a revised edition. Studies in Plant Science, v.5, 1996. p.767.

BRIGHIGNA, L.; FIORDI, A.C.; PALANDRI, M.R. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. **Phytomorphology**, v.34, p.191-200, 1984.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

BUKATSCH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.

CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, n.2, p.79-83, 1999.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Archivos de Zootecnia**. v.57, n.1, p.13-28, 2008.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. 1. ed. Lavras-MG: Editora UFLA, 2009. v.1, 234 p.

CEITA, G.O.; ASSIS, J.G.A.; GUEDES, M.L.S.; OLIVEIRA, A.L.P.C. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.158, n.1, p.189–193, 2008.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.3, p.780-787, 2009.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.29, n.58, p.49-59, 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum' **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.488-490, 2005.

FRÁGUAS, C.B.; DORNELLES, C.M.V.; LIMA, G.P.P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1682-1687, 2009.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.S. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Ceres**, v.54, n.311, p.63-67, 2007.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.D. **Strategies for the micropropagation of bromeliads**. In: JAIN, S.M., OCHATT, S.J. (Eds.), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: methods in molecular biology*, v.589. Humana Press, New York, 2010. p.47–66.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v.8, n.9, p.453-9, 2003.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940, 523p.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v.114, n.4, p.525-537, 2001.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.41-78.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M. A. & SANCHEZ-TAMES, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, n.3, p.207–214, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n. 6772, p.853–858, 2000.

NAMLI, S.; AYAZ, E. Influence of different cytokinins used in *in vitro* culture on the stoma morphology of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.5, p.561-563, 2007.

NEGRELLE, R.R.B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.34, n.1, p.91-100, 2012.

OLIVEIRA, M.K.T.; BEZERRA NETO, F.; CÂMARA, F.A.A.; NUNES, G.H.S.; OLIVEIRA, F.A. Propagação “in vitro” da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.167-171, 2007.

OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; CASTRO, E.M.; SANTANA, J.R.F.; NOGUEIRA, R.C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1447-1451, 2008.

PASQUAL, M.; SANTOS, F.C.; FIGUEIREDO, M.A.; JUNQUEIRA, K.P.; REZENDE, J.C.; FERREIRA, E.A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.1, p.45-49, 2008.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus* cf. *scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24 (Edição Especial), p.74-80, 2000.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.; HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, n.6, p.1141-1153, 2009.

SANTOS, A.J.; BITTENCOURT, A.M.; NOGUEIRA, A.S. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral paranaense. **Floresta**, v.35, n.3, p.409-417, 2005.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; GESING, J.P.A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia**, v.63, n.1, p.135-138, 2008a.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; BORTOLI, C.L.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **Iheringia**, v.64, n.2, p.151-156, 2009.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.M.; BRAGA, F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, v.33, n.11, p.839-843, 2008b.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52 n.4, p. 923-932, 2009.

SWAIN, S.S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P.K.; CHAND, P.K. Photosynthetic and transpiration responses of *in vitro*-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.134–141, 2010.

VESCO, L.L.D.; STEFENON, V.M.; WELTER, L.J.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.28, n.4, p.515-522, 2011.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.18, p.10487-10492, 2001.

### 3.2. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (BROMELIACEAE)

#### Resumo

A cultura de tecidos pode contribuir na propagação de várias espécies de interesse comercial, como as bromeliáceas. Objetivou-se neste trabalho avaliar os tipos e os níveis de auxinas na rizogênese *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia concentrica*. Brotos de *N. concentrica* foram induzidos em meio de cultivo com 15,0  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina por 80 dias, seguido de subcultivo em meio isento de fitorreguladores por 45 dias. Na rizogênese *in vitro*, os brotos foram cultivados por 60 dias em meio suplementado com ácido indol-3-butírico (AIB) ou ácido naftaleno-acético (ANA) (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu\text{M}$ ). Para rizogênese *ex vitro*, os brotos tiveram suas bases imersas por 60 minutos em solução de AIB ou ANA (0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu\text{M}$ ). Após imersão, os brotos foram plantados em bandejas plásticas contendo vermiculita e cultivados por 45 dias. Ao final de cada método de rizogênese, foi realizada a análise dos caracteres fitotécnicos. Observou-se maior enraizamento *in vitro* (30 dias) e maior número de raízes nos brotos cultivados em meio com 3,0  $\mu\text{M}$  de ANA, já na rizogênese *ex vitro*, observou-se maior número de raízes e com maior comprimento médio quando aplicado 5,0  $\mu\text{M}$  de AIB.

Palavras-chave: auxinas, bromélia, cultura de tecidos

#### Abstract

Tissue culture can contribute to the spread of many commercial species, such as bromeliads. The objective was to evaluate the type and level of auxins on rooting *in vitro* and *ex vitro* *Neoregelia concentrica*. Shoots of *N. concentrica* were induced in culture medium with 15,0  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine for 80 days followed by subculture on growth regulators free medium for 45 days. *In vitro* rooting, the shoots were cultured for 60 days in medium supplemented with acid indole-3-butyric-acid (IBA) or

naphthalene-acetic acid (NAA) (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 and 4,0  $\mu$ M). For *ex vitro* rooting, the shoots had their bases immersed for 60 minutes in a solution of IBA or NAA (0,0; 5,0; 10,0 and 15,0  $\mu$ M). After immersion, the shoots were planted in plastic trays containing vermiculite and grown for 45 days. At the end of each method of rooting, we conducted the analysis of characters phytotechnical. Observed higher *in vitro* rooting (30 days) and greater number of roots in shoots grown in medium containing 3,0  $\mu$ M NAA, already in *ex vitro* rooting, we observed greater number of roots and higher average length when applied 5,0  $\mu$ M IBA.

Key-words: auxins, bromeliad, tissue culture

### Introdução

O bioma Mata Atlântica, considerado um *hotspot* com aproximadamente 8% da área original preservada, possui várias espécies endêmicas de bromélias (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009). Essas plantas são ecologicamente importantes por serem fontes de frutos carnosos, néctar, água (acumulada entre as folhas) e abrigo para mamíferos, anfíbios, pássaros e insetos, principalmente as espécies da subfamília Bromelioideae (BALKE et al., 2008).

As bromélias também apresentam importante valorização comercial como planta ornamental, devido à beleza de suas folhas e flores (VESCO et al., 2011). Por essa razão, a coleta ilegal em ambientes naturais tem sido realizada com a finalidade de complementação de renda e vem colocando algumas espécies em ameaça de extinção (NEGRELLE et al., 2012). Por isso é desejável a multiplicação em massa e a reintrodução destas espécies visando o restabelecimento ecológico. Dentre os métodos de multiplicação mais frequentes, tem-se a propagação por sementes ou divisão de brotos laterais, porém tais métodos convencionais não são apropriados para a produção massal requerida (CARNEIRO et al., 1999). Dessa forma, técnicas como o cultivo *in vitro*, podem ser aplicadas para a propagação em massa de bromélias (GUERRA & VESCO, 2010; PICKENS et al., 2006).

Alguns trabalhos relacionados ao efeito de fitorreguladores na morfogênese *in vitro* de bromeliáceas foram descritos por Silveira et al. (2009) com *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, Huang et al. (2011b) com *Guzmania* 'Hilda', Pompelli & Gerra (2005) com *Dyckia distachya* Hassler e Droste et al. (2005) com *Vriesea gigantea* Gaudich. e *Vriesea philippocoburgii* Wawra. Estes autores mostraram que essa técnica é potencialmente importante para a multiplicação desse grupo



taxonômico. Outros trabalhos, como os de Alves et al. (2006) com *Vriesea reitzii* Leme & Costa e Hang et al. (2011) com *Aechmea fasciata* Baker, verificaram a partir de brotos produzidos *in vitro*, a capacidade rizogênica *in vitro* e *ex vitro*, respectivamente.

O objetivo deste estudo foi avaliar os tipos e os níveis de auxinas na rizogênese *in vitro* e *ex vitro* da bromélia *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith.

## Material e Métodos

### Cultivo e multiplicação *in vitro*

Plantas de *N. concentrica* previamente estabelecidas *in vitro* por meio de sementes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido estacionário, suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 58,439 mM de sacarose e 15,0 µM de BAP (6-benzilaminopurina). Após 80 dias de cultivo, as brotações formadas foram subcultivadas por 45 dias em frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio MS líquido estacionário isento de fitorreguladores e suplementado com 58,439 mM de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento a 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos.

### Enraizamento *in vitro*

Brotações com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, provenientes da fase de multiplicação *in vitro*, foram individualizadas com o auxílio de bisturi e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS solidificado com 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Este meio foi suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 58,439 mM de sacarose e níveis de 0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µM de AIB (ácido indol-3-butírico) ou ANA (ácido naftaleno-acético), totalizando 10 tratamentos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido por 60 dias em sala de crescimento a 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos.

A avaliação foi realizada em dois tempos (30 e 60 dias) para as variáveis: enraizamento (%) e número médio de raízes; já para o comprimento da maior raiz (cm) (mensurado com régua milimetrada) aos 60 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (cinco níveis X dois tipos de auxinas) e composto de quatro repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por oito tubos de ensaio, totalizando 32 explantes por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e análise de regressão.

### **Enraizamento *ex vitro***

Brotões, com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, provenientes da fase de multiplicação *in vitro*, foram individualizadas com o auxílio de bisturi e lavadas em água corrente para remoção do meio de cultivo aderido.

Os brotos tiveram a base imersa por 60 minutos em ANA ou AIB nos níveis de 0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu\text{M}$ . Em seguida, o material vegetal foi plantado em bandejas plásticas com células individuais contendo substrato vermiculita.

Após o plantio dos brotos, o material foi mantido em casa de vegetação com nebulização intermitente (70% UR e temperatura 30°C). A cada 20 dias foi realizada a suplementação do substrato com solução MS com metade da concentração dos sais.

A avaliação foi feita aos 40 dias de cultivo e as variáveis analisadas foram: enraizamento (%), comprimento da maior raiz (cm) (mensurado com régua milimetrada), número médio de raízes, volume ( $\text{mm}^3$ ) e área superficial do sistema radicular ( $\text{mm}^2$ ). Para estas duas últimas análises, foram feitas fotografias milimetradas das raízes individualizadas e com o auxílio do software SAFIRA® (JORGE & RODRIGUES, 2008) realizadas as medições.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (quatro níveis X dois tipos de auxinas) e composto de quatro repetições, sendo cada parcela formada por oito brotos, totalizando 32 explantes por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e análise de regressão.

## Resultados e Discussão

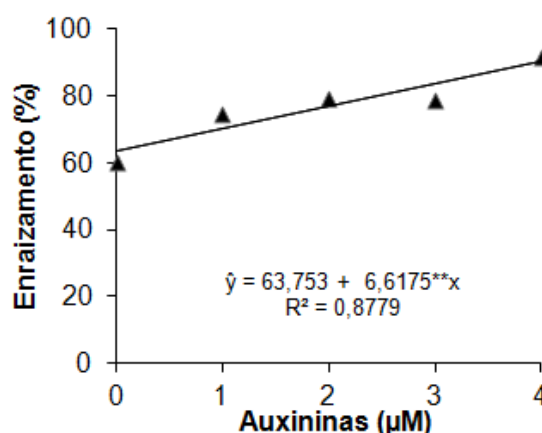
Por meio da análise de variância, verificou-se diferença significativa no enraizamento *in vitro* das brotações de *N. concentrica* em função dos tratamentos para a porcentagem de enraizamento aos 30 dias e para o número de raízes aos 30 e 60 dias após a inoculação dos explantes (Tabela 1).

**TABELA 1.** Resumo da análise de variância para as características fitotécnicas relacionadas ao enraizamento *in vitro* de *Neoregelia concentrica* em meios de cultivo com diferentes níveis e tipos de auxina (AUX)

Fontes de Variação	Quadrado médio				
	E30	E60	NR30	NR60	CR
AUX	0,34**	0,020 <sup>ns</sup>	68,67**	94,28**	0,115 <sup>ns</sup>
NÍVEL	0,09*	0,005 <sup>ns</sup>	15,56**	19,83**	0,145 <sup>ns</sup>
AUX x NÍVEL	0,05 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>ns</sup>	9,47**	12,59**	0,024 <sup>ns</sup>
ERRO	0,02	0,009	1,10	1,46	0,172
Média Geral	0,77	0,954	3,19	5,24	2,19
C.V. (%)	21,04	9,96	32,85	23,07	18,87

<sup>ns</sup> Não significativo a 5% pelo teste F; \*, \*\* Significativo a 5% e 1%, respectivamente pelo teste F. Enraizamento aos 30 dias (E30), enraizamento aos 60 dias (E60), número médio de raízes aos 30 dias (NR30), número médio de raízes aos 60 dias (NR60) e comprimento médio da maior raiz (CR).

O enraizamento *in vitro* de *N. concentrica* aos 30 dias, apresentou comportamento linear crescente com o aumento dos níveis, independente das auxinas utilizadas, atuando positivamente na formação de raízes (Figura 1). O maior nível de auxinas resultou em 91,45% e a ausência em 60,40% de enraizamento, com diferença de 31,05%. Segundo Carneiro et al. (1999), todos os brotos de *N. cruenta* (R. Graham) L.B. Smith enraizaram após transferência para meio com ausência de auxinas. Arrabal et al. (2002) verificaram também a formação de raízes em explantes da bromélia *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith cultivados em meio sem auxinas, mostrando que determinadas espécies apresentam potencial rizogênico maior que outras. O mesmo foi observado em abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), em que todos os brotos enraizaram *in vitro* em meio sem regulador de crescimento (SRIPAORAYA et al., 2003).



**FIGURA 1.** Enraizamento *in vitro* (%) de *N. concentrica* aos 30 dias em função dos tipos e níveis de auxinas (\*\* coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

Quando se empregou ANA nos meios de cultivo, a porcentagem de enraizamento aos 30 dias foi superior em 18,5% se comparado ao AIB (Tabela 2). Mendes et al. (2008) obtiveram maior indução de enraizamento *in vitro* com a bromélia *Vriesea cacuminis* L.B. Smith quando utilizaram ANA nos meios de cultivo em relação ao AIB, semelhante ao verificado na bromélia em estudo. A utilização de auxinas sintéticas tem sido indicada com o objetivo de acelerar a formação de raízes e aumentar o percentual de enraizamento (SANTOS et al., 2010a), o que condiz com os resultados obtidos com *N. concentrica*, nos quais se verificou menor indução de raízes aos 30 dias de cultivo quando não se empregou suplementação exógena de auxina em relação aos demais tratamentos (Figura 1).

Aos 60 dias, houve elevada porcentagem de indução de raízes nos explantes com AIB e ANA, sendo estatisticamente iguais (Tabela 2). Estes resultados mostram que as auxinas, independente do tipo, são importantes para o enraizamento *in vitro* de brotos desta espécie.

**TABELA 2** – Influência de auxinas no enraizamento *in vitro* de *N. concentrica* aos 30 e 60 dias

Auxinas	Enraizamento (%)*	
	30 dias	60 dias
AIB	67,7 b	93,2 a
ANA	86,2 a	97,6 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os meios isentos de auxinas apresentaram média de 60% e 91% (dados não mostrados) de enraizamento aos 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente. Isso

provavelmente se deve pela concentração endógena de AIA (ácido 3-indoacético). Esta auxina natural, produzida nas folhas e nas gemas, move-se naturalmente para a parte inferior da planta, aumentando a sua concentração na base do corte, em conjunto com outras substâncias endógenas, estimulando a formação de raízes (HARTMANN et al., 2011; LONE et al., 2010).

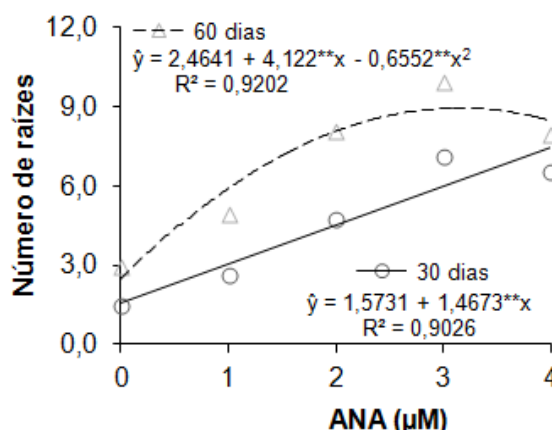
O número de raízes apresentou interação significativa entre os tipos e os níveis de auxinas. Aos 30 dias, o maior número de raízes foi observado nos meios que utilizaram níveis iguais ou superiores a 2,0  $\mu\text{M}$  de ANA. No presente trabalho a absorção inicial e o acúmulo de BAP em meio indutor dos brotos além da sua consequente transferência para meio indutor de enraizamento no nível de 2,0  $\mu\text{M}$  de ANA pode ter propiciado um balanço hormonal favorável para a produção de raízes. Segundo Mercier et al. (2003) as citocininas são necessárias, em conjunto, com auxinas, para a divisão celular na transição da fase G1-S para G2-S. Já aos 60 dias, apenas os meios que não empregaram suplementação auxínica (0,0  $\mu\text{M}$ ) foram semelhantes entre si, sendo os meios com ANA com as maiores médias em relação ao AIB (Tabela 3).

**TABELA 3** – Número de raízes *in vitro* de *N. concêntrica* aos 30 e 60 dias em função dos tipos e níveis de auxinas

Níveis ( $\mu\text{M}$ )	Número de raízes*			
	30 dias		60 dias	
	AIB	ANA	AIB	ANA
0,0	1,458 a	1,441 a	2,95 a	2,96 a
1,0	1,642 a	2,647 a	3,58 b	4,94 a
2,0	1,864 b	4,753 a	4,39 b	8,07 a
3,0	1,643 b	7,120 a	3,39 b	9,93 a
4,0	2,826 b	6,557 a	4,20 b	7,97 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliado o nível de citocinina para o número de raízes, apenas as plantas cultivadas com ANA foram diferentes entre si, apresentando comportamento linear e quadrático com o aumento dos níveis aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente (Figura 2). Resultados semelhantes foram verificados em *Billbergia rosea* Hortus ex Beer, que apresentou incremento do número de raízes com o aumento do nível de ANA durante o cultivo *in vitro* (PARDO et al., 2008).



**FIGURA 2.** Número de raízes *in vitro* de *N. concentrica* aos 30 e 60 dias em função dos níveis de ANA (\*\* coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

Não foi constatada diferença significativa para o comprimento médio da maior raiz em *Neoregelia concentrica* (Tabela 4). De acordo com Poornima & Ravishankar (2007) as auxinas podem ter um efeito negativo no crescimento de raízes adventícias *in vitro* quando as plantas permanecem durante todo o tempo na presença dessas, o que não foi observado nos níveis de AIB e ANA empregados em *N. concentrica*. Galvanese et al. (2007) observaram que o aumento dos níveis de ANA no meio de cultivo induziu a formação de raízes de menor comprimento em *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith.

**TABELA 4.** Comprimento da maior raiz *in vitro* de *N. concentrica* em função dos tipos e níveis de auxinas

Níveis (μM)	Comprimento da maior raiz (cm)*	
	AIB	ANA
0,0	2,345 a	2,350 a
1,0	1,972 a	2,197 a
2,0	2,275 a	2,415 a
3,0	1,990 a	2,177 a
4,0	2,147 a	2,132 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na condição de cultivo *ex vitro*, obteve-se 100% de sobrevivência, sendo verificada a emissão de raízes na base de todas as brotações de *N. concentrica*. Pompelli & Gerra (2005) também obtiveram altas taxas no enraizamento *ex vitro* ao trabalharem com a bromélia *Dyckia distachya* Hassler. Estes autores obtiveram mais de 79% de enraizamento nos brotos transferidos diretamente para o substrato, independente do nível de auxina aplicada na base.

O uso da vermiculita no presente trabalho, assim como outros substratos como a perlita, apresenta grande macroporosidade que garante alta capacidade de aeração e retenção de água, o que propicia uma melhor exploração do sistema radicular, consequentemente maior crescimento de parte aérea, uniformidade e alta taxa de sobrevivência da muda, principalmente na aclimatização (COSTA et al., 2009; RUTA & FORTUNATO, 2010). Estas características do substrato utilizado associado provavelmente ao AIA endógeno sintetizado nas gemas e folhas jovens possivelmente foram capazes de assegurar a indução de raízes nos explantes de *N. concentrica*, mesmo na ausência de aplicação de auxinas.

O número de raízes encontradas também em explantes não tratados com auxinas deve-se provavelmente ao fornecimento a cada 20 dias do meio MS com metade da concentração dos sais. O uso de solução nutritiva MS para irrigar *Acanthostachys strobilaceae* (Schult. F.) Klotzsch propiciou melhor crescimento do sistema radicular durante a aclimatização (SANTOS et al., 2010b).

Fatores abióticos também ajudam a explicar a emissão de raízes em explantes não tratados com auxinas no processo de aclimatização, como a luz, por meio de sua qualidade ou quantidade espectral, como por exemplo, os níveis de irradiância que interferem no acúmulo de fotoassimilados (HUANG et al., 2011a). Determinados níveis de irradiância podem causar elevação da temperatura, o que pode acarretar em acúmulo de metabólitos como o mio-inositol, glicose, frutose e sacarose o que pode estar relacionado à manutenção da homeostase da planta, principalmente em fases iniciais de aclimatização (MOLLO et al., 2011). A temperatura também atua em outras vias, como na fixação de carbono (CAM ou C<sub>3</sub>) verificado em abacaxizeiro *in vitro* (NIEVOLA et al., 2005).

No enraizamento *ex vitro*, foi verificada alta taxa de enraizamento e ausência de variância para porcentagem de enraizamento, entretanto, para as demais variáveis observou-se diferenças significativas em função dos tipos e níveis de auxinas aplicados nos brotos de *N. concentrica* (Tabela 5).

**TABELA 5.** Resumo da análise de variância para as características fitotécnicas relacionados ao enraizamento *ex vitro* de *Neoregelia concentrica* em meios de cultivo com diferentes níveis e tipos de auxina (AUX)

Fontes de Variação	Quadrado médio			
	NR	CR	VO	AS
AUX	3,0752**	0,6356*	2283,8**	37209,2**
NÍVEL	2,2732**	0,3101 <sup>ns</sup>	5886,9**	62400,1**
AUX x NÍVEL	6,9791**	0,7413**	13439,0**	126571,0**
ERRO	0,3589	0,1176	277,7	4121,2
Média Geral	4,14	3,77	103,29	359,51
C.V. (%)	14,46	9,09	16,13	17,86

<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F. \*,\*\* Significativo ao nível de 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F. Porcentagem de enraizamento (PR), número médio de raízes (NR), comprimento médio da maior raiz (CR), volume (VO), área superficial do sistema radicular (AS).

O número de raízes no cultivo *ex vitro* apresentou interação entre os tipos e níveis de auxinas. Os explantes cultivados em meio com 5,0  $\mu\text{M}$  de AIB obtiveram maior média para essa variável (6,19 raízes) em relação à ANA (Tabela 6). Os melhores resultados conseguidos com AIB no cultivo *ex vitro* (Tabela 6) possivelmente podem ser explicados pelo fato desse fitorregulador ser metabolizado em aspartato de AIB e posteriormente conjugado com peptídeos. Essa forma conjugada serve para o armazenamento dessa auxina, que posteriormente pode ser liberada gradualmente e assim manter a concentração em nível adequado, especialmente nas fases finais de formação da raiz (RODRIGUES & LEITE, 2004).

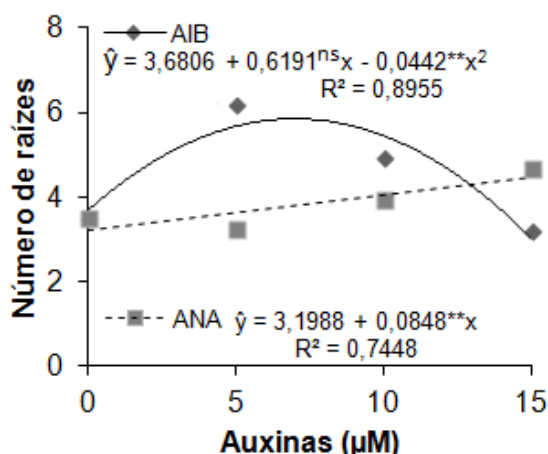
**TABELA 6.** Número de raízes *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos tipos e níveis de auxinas aos 40 dias em vermiculita

Níveis ( $\mu\text{M}$ )	Número de raízes*	
	AIB	ANA
0,0	3,507 a	3,502 a
5,0	6,190 a	3,220 b
10,0	4,930 a	3,940 b
15,0	3,190 b	4,675 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando verificado o nível dentro de cada tipo de auxina, o comportamento quanto ao número de raízes foi quadrático para AIB e linear para ANA com o aumento do nível (Figura 3).





**FIGURA 3.** Número de raízes *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos níveis de AIB e ANA aos 40 dias em vermiculita (<sup>ns</sup> coeficiente não significativo a 5% pelo teste t; <sup>\*\*</sup> coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

Como no enraizamento *in vitro*, o *ex vitro* também é afetado pelos tipos e níveis de auxinas (YAN et al., 2010). O enraizamento *ex vitro* realizado diretamente no substrato apresenta como vantagens a diminuição das dificuldades associadas à sobrevivência na aclimatização e a redução dos custos de produção (AUGUSTO et al., 2006).

A aplicação de auxinas na base de estacas ou brotos, em níveis crescentes, produz efeito estimulador na indução de raízes até um ponto máximo, a partir do qual, qualquer acréscimo do nível da auxina se torna inibitório (HARTMANN et al., 2011), o que condiz com os resultados obtidos com AIB, em que níveis superiores a 7,0 μM são prejudiciais para a formação de raízes em *N. concentrica* (Figura 3).

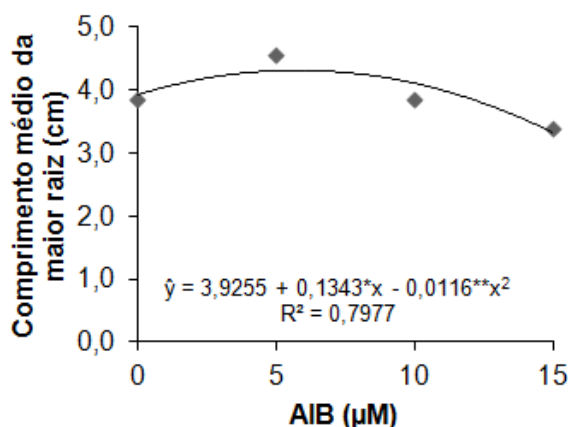
O comprimento da maior raiz no cultivo *ex vitro* também apresentou interação dos fatores, sendo a maior média obtida com 5,0 μM de AIB (Tabela 7).

**TABELA 7.** Comprimento da maior raiz *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos tipos e níveis de auxinas aos 40 dias em vermiculita

Níveis (μM)	Comprimento da maior raiz (cm)*	
	AIB	ANA
0,0	3,8425 a	3,8675 a
5,0	4,5550 a	3,4475 b
10,0	3,8550 a	3,5150 a
15,0	3,4025 a	3,6975 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliado o nível para o comprimento da maior raiz apenas os brotos tratados com AIB foram diferentes entre si, apresentando comportamento quadrático com o aumento do nível (Figura 4). O melhor nível de AIB para esta característica foi de 5,13  $\mu\text{M}$ . A emissão de raízes em maior número e comprimento é fundamental quando o objetivo é a produção de mudas em escala comercial (ZIETEMANN & ROBERTO, 2007). Além disso, o sistema radicular bem formado aumenta a área de solo a ser explorado, favorecendo a absorção de nutrientes e água, o que proporciona melhor crescimento da muda (FRACARO & PEREIRA, 2004; CARVALHO JUNIOR et al., 2009).



**FIGURA 4.** Comprimento médio da maior raiz *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos níveis de AIB aos 40 dias em vermiculita (\*; \*\* coeficiente significativo a 5% e 1% pelo teste t, respectivamente).

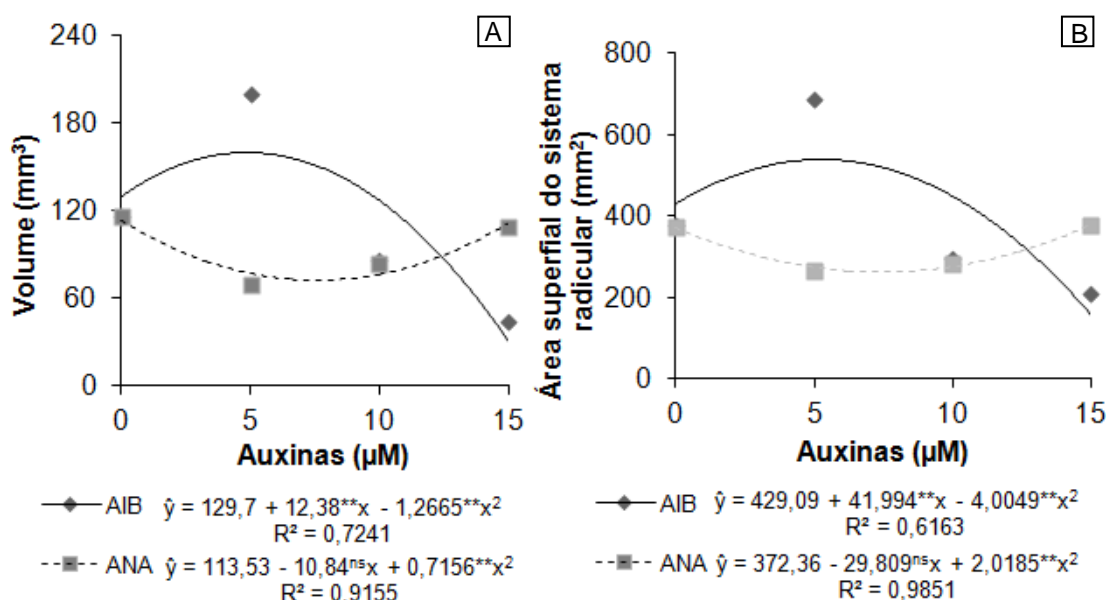
O volume e a área superficial do sistema radicular tiveram interação significativa entre os fatores. Quando os brotos foram tratados com 5,0  $\mu\text{M}$  de AIB, as raízes formadas obtiveram maiores médias para essas variáveis em relação ao mesmo nível de ANA (Tabela 8).

**TABELA 8** – Volume ( $\text{mm}^3$ ) e área superficial do sistema radicular ( $\text{mm}^2$ ) *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos tipos e níveis de auxinas aos 40 dias em vermiculita

Níveis ( $\mu\text{M}$ )	Volume ( $\text{mm}^3$ )		Área superficial do sistema radicular ( $\text{mm}^2$ )	
	AIB	ANA	AIB	ANA
0,0	116,26 a	115,96 a	378,89 a	375,14 a
5,0	200,26 a	69,92 b	689,53 a	265,42 b
10,0	86,54 a	83,98 a	297,94 a	284,47 a
15,0	43,89 b	109,51 a	208,08 b	376,61 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise dos níveis em cada tipo de auxina, os comportamentos foram semelhantes para o volume e área superficial do sistema radicular, sendo quadrática para ambas com aumento do nível. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de AIB, no qual o volume e a área superficial do sistema radicular apresentaram maiores valores com os níveis de 4,88 e 5,24  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 5). Maior número de raízes fisiologicamente ativas concomitantemente com a maior área superficial radicular promove aumento do volume que pode ser explorado representando vantagem significativa, uma vez que colabora para a maior adaptação das plantas ao ambiente do solo sob várias condições adversas, bem como para o aumento da absorção de nutrientes (NIBAU et al., 2008; RIMA et al., 2011).

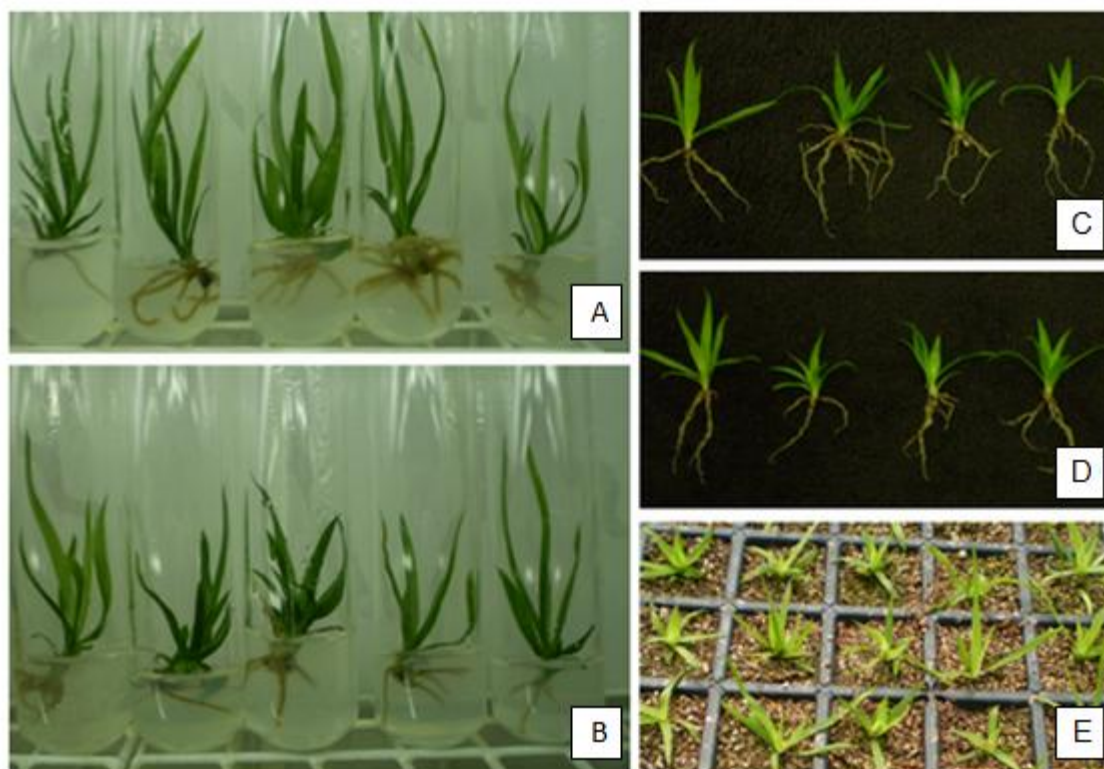


**FIGURA 5.** Volume ( $\text{mm}^3$ ) e área superficial do sistema radicular ( $\text{mm}^2$ ) *ex vitro* de *N. concentrica* em função dos tipos e níveis de auxinas aos 40 dias em vermiculita (<sup>ns</sup> coeficiente não significativo a 5% pelo teste t; <sup>\*\*</sup> coeficiente significativo a 1% pelo teste t).

Na morfologia do sistema radicular formado *in vitro* e *ex vitro*, independente dos tipos e níveis de auxinas, observaram-se características distintas entre os métodos de enraizamento. As raízes formadas *in vitro* eram mais frágeis e não apresentaram ramificações, diferente do averiguado no método *ex vitro*, no qual foram mais resistentes e com raízes secundárias (Figura 6).

Essas características também foram observadas em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) por Borkowska (2001) e em *Siratia grosvenorii* por Yan et al.

(2010). Todavia, isso não é comum a todas as espécies vegetais, pois no trabalho de Pompelli & Gerra (2005) com *Dickia distachya*, as raízes formadas *ex vitro* foram limitadas e frágeis, em contraposição as formadas *in vitro* que foram mais numerosas e funcionais.



**FIGURA 6.** Aspectos morfológicos de brotos de *N. concentrica* enraizados *in vitro* e *ex vitro* aos 40 dias de cultivo. A – Enraizamento *in vitro* com ANA (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu$ M); B – Enraizamento *in vitro* com AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu$ M); C - Enraizamento *ex vitro* com AIB (0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu$ M); D - Enraizamento *ex vitro* com ANA (0,0; 5,0; 10,0 e 15,0  $\mu$ M) ambos da esquerda para direita; E – Plantas nas condições *ex vitro*.

### Conclusões

O tipo de auxina influencia na resposta rizogênica das brotações de *Neoregelia concentrica*, sendo indicado o uso de ANA no enraizamento *in vitro* e AIB no *ex vitro*.

O emprego de 3,0  $\mu$ M de ANA na suplementação do meio de cultivo foi eficiente na indução de raízes no método de enraizamento *in vitro* dos brotos de *Neoregelia concentrica*.

A aplicação de 5,0  $\mu$ M de AIB na base das brotações de *Neoregelia concentrica* foi o melhor nível para o crescimento *ex vitro* do sistema radicular.

### Referências Bibliográficas

- ALVES, G.M.; VESCO, L.L.D.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v.110, n.2, p.204–207, 2006.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L.A.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, v.11, n.6, p.1081-1089, 2002.
- AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.473-476, 2006.
- BALKE, M.; GOMEZ-ZURITA, J.; RIBERA, I.; VILORIA, A.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; GARCIA, M.; HENDRICH, L.; VOGLER, A. P. Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the neotropical forest canopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.17, p.6356-6361, 2008.
- BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.89, n.3, p.195-206, 2001.
- CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, n.2, p.79-83, 1999.
- CARVALHO JUNIOR, W.G.O.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R. Comprimento da estaca no desenvolvimento de mudas de alecrim-pimenta. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2199-2202, 2009.
- COSTA, E.; RODRIGUES, E. T.; ALVES, V. B.; SANTOS, L. C. R. dos; VIEIRA, L. C. R. Efeitos da ambiência, recipientes e substratos no desenvolvimento de mudas de Maracujazeiro amarelo em Aquidauana, MS. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.31, n.1, p.236-244, 2009.
- DROSTE, A.; SILVA, A.M.; MATOS, A.V.; ALMEIDA, J.W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.5, p.717-722, 2005.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449, 2004.

FRACARO, A.A.; PEREIRA, F.M. Distribuição do sistema radicular da goiabeira 'Rica' produzida a partir de estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.183-185, 2004.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.S. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, v.54, n.311, p.63-67, 2007.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.D. **Strategies for the micropropagation of bromeliads**. In: JAIN, S.M., OCHATT, S.J. (Eds.), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants: methods in molecular biology*, v. 589. Humana Press, New York, 2010, p.47–66.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES-JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

HUANG, P.L.; LIAO, L.J.; TSAI, C.C.; LIV, Z.H.; Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.1, p.73-78, 2011a.

HUANG, P.L.; LIU, Z.H.; CHANG, M.L.; LIAO, L.J. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, v.130, n.4, p.894–898, 2011b.

JORGE, L.A.C.; RODRIGUES, A.F.O. Safira: sistema de análise de fibras e raízes. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Instrumentação Agropecuária, n.24, 2008.

LONE, A.B.; UNEMOTO, L.K.; YAMAMOTO, L.Y.; COSTA, L.; SCHNITZER, J.A.; SATO, A.J.; RICCE, W.S.; ASSIS, M.A.; ROBERTO, S.R. Enraizamento de estacas de azaleia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1720-1725, 2010.

MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Enraizamento *in vitro* de *Vriesea cacuminis* L.B.Smith (BROMELIACEAE) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.969-971, 2007.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.2, p.107-112, 2003.

MOLLO, L.; MARTINS, M.C.M.; OLIVEIRA, V.F.; NIEVOLA, C.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C.L. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.1, p.141-149, 2011.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n.6772, p.853–858, 2000.

NEGRELLE, R.R.B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.34, n.1, p.91-100, 2012.

NIBAU, C.; GIBBS, D.J.; COATES, J.C. Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. **New Phytologist**, v.179, n.3, p.595-614, 2008.

NIEVOLA, C.C.; KRAUS, J.R.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C<sub>3</sub> photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.41, n.6, p.832-837, 2005.

PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* Hortus ex Beer a partir de ápices caulinares. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, v.42, n.4, p.491–505, 2008.

PICKENS, K.; WOLF, J.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.42, n.4, p.348–353, 2006.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta e Ambiente**, v.12, n.2, p.42-49, 2005.

POORNIMA, G.N.; RAVISHANKAR, R.V. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.20, p.2348-2352, 2007.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.; HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, n.6, p.1141-1153, 2009.

RIMA, J.A.H.; MARTIM, S.A.; DOBBSS, L.B.; EVARISTO, J.A.M.; RETAMA, C.A.; FAÇANHA, A.R.; CANELLAS, L.P. Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.614-620, 2011.

RODRIGUES, T.J.D.; LEITE, I.C. **Fisiologia vegetal**: hormônios das plantas. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2004. v.1. 78 p.

RUTA, C.; FORTUNATO, I.M. *In vitro* propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.46, n.2, p.172-179, 2010.



SANTOS, H.A.; MELLO, S.C.M.; PEIXOTO, J.R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido-indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, v.26, n.6, p.966-972, 2010a.

SANTOS, D.S. dos; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C.C. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.6, p.524-529, 2010b.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.923-932, 2009.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, n.5, p.450-454, 2003.

VESCO, L.L.D.; STEFENON, V.M.; WELTER, L.J.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.28, n.4, p.515-522, 2011.

YAN, H.; LIANG, C.; YANG, L.; LI, Y. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.1, p.115-120, 2010.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S.R. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. Paluma e Século XXI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.31-36, 2007.



### 3.3. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE *Neoregelia concentrica* DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO EM RESPOSTA AO NÍVEL DE LUZ

#### Resumo

A propagação *in vitro* pode ser uma boa alternativa para reprodução clonal de várias espécies. Todavia, na fase de aclimatização podem ocorrer altos índices de mortalidade, muitas vezes devido a fatores abióticos, como a mudança brusca no nível de irradiância. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do nível de luz durante a aclimatização no estabelecimento *ex vitro* de *Neoregelia concentrica* por meio de análises dos comportamentos fotossintéticos e de crescimento. Plantas de *N. concentrica* foram previamente multiplicadas e enraizadas *in vitro* em meio de cultivo MS. Essas foram plantadas em bandejas plásticas com células individuais contendo substrato vermiculita. Os tratamentos consistiram no cultivo *ex vitro* das plantas nos níveis de luz 30%, 50%, 70% e em pleno sol (100% de luz) por 28 dias. Para a análise dos comportamentos fotossintéticos, medidas da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* foram realizadas nos períodos 0 (*in vitro*), 7, 14, 21 e 28 dias de aclimatização. Para a análise de caracteres de crescimento, 25 plantas foram coletadas, medidas e pesadas aos 28 dias de aclimatização. A alta irradiância induziu a fotoinibição e baixa taxa de crescimento nas plantas sob pleno sol (100% de luz). As plantas cultivadas com redução parcial de luz (30%, 50% e 70%) tiveram menor efeito inibitório, com recuperação total aos 21 dias de aclimatização nas plantas sob 50% e 70% de luz. A redução do nível de luz em 50% na aclimatização de *N. concentrica* permitiu rápida recuperação e maior taxa de crescimento das plantas.

Palavras-chave: bromélia, cultura de tecidos, fotoinibição

## Abstract

The *in vitro* propagation can be a good alternative to clonal reproduction of various species. However, during the acclimatization phase may occur high rates of mortality, often due to abiotic factors such as a sudden change in level of irradiance. Thus, the objective was to evaluate the effect of light level during acclimatization in *ex vitro* establishment of *Neoregelia concentrica* by analysis of photosynthetic behaviors and growth. Plants of *N. concentrica* were previously multiplied and rooted *in vitro* on MS medium. These were planted in plastic trays with individual cells containing vermiculite. The treatments consisted of *ex vitro* cultivation of plants in the light levels 30%, 50%, 70% and full sunlight (100% light) for 28 days. To analyze the behavior photosynthetic kinetic measurements of fluorescence of chlorophyll a transient were performed at 0 (*in vitro*), 7, 14, 21 and 28 days of acclimatization. For the analysis of growth traits, 25 plants were collected, measured and weighed at 28 days of acclimatization. The high irradiance induced photoinhibition and low rate of growth in plants under full sunlight (100% light). The plants grown under partial reduction of light (30%, 50% and 70%) had less inhibitory effect, with total recovery to 21 days of acclimatization in plants under 50% and 70% of light. Reducing the level of light in the acclimatization of 50% *N. concentrica* allowed rapid recovery and higher rates of plant growth.

Key-words: bromeliad, tissue culture, photoinhibition

## Introdução

As técnicas de propagação *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a multiplicação rápida de várias espécies de plantas economicamente importantes ou ameaçadas de extinção, como as da família Bromeliaceae (PICKENS et al., 2006; GUERRA & VESCO, 2010). Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de bromélias já foram relatados por Droste et al. (2005), Pompelli & Gerra (2005) e Huang et al. (2011b), e mostraram que essas técnicas são potencialmente importantes para a multiplicação de espécies dessa família.

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas normalmente são cultivadas sob-baixa densidade de fluxo de fótons (SEON et al., 2000) e em meio de cultivo acrescido de carboidratos, o que caracteriza uma condição heterotrófica ou mixotrófica (ARIGITA et al., 2002; KOZAI & KUBOTA, 2001). Essa condição pode induzir a deficiências fisiológicas durante a aclimatização que dificultam o deslocamento do comportamento mixo-heterotrófico para o autotrófico, resultando em altos índices de mortalidade após a transferência para o ambiente *ex vitro* (BRITO et al., 2009; SÁEZ et al., 2012), inviabilizando todas as etapas do cultivo *in vitro* (HAZARIKA, 2006).

Na aclimatização, que corresponde à transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*, é fundamental a adaptação das plantas às novas condições ambientais (APÓSTOLO et al., 2005), dentre elas, o aumento substancial da irradiância, que desafia os mecanismos de foto-proteção das plantas propagadas *in vitro* e pode induzir a fotoinibição (OSÓRIO et al., 2010; SÁEZ et al., 2012). A alta luminosidade pode levar ao aumento da geração de oxigênio ativo, que frequentemente acarreta em danos por foto-oxidação deletérios devido à produção de peróxidos e superóxidos (ASADA, 2006; MICHAEL & KRISHNASWAMY, 2011).

Durante a aclimatização, o uso de ferramentas importantes, como a análise da fluorescência da clorofila *a* pode auxiliar no monitoramento das alterações que ocorrem nas plantas propagadas *in vitro* (SWAIN et al., 2010). Essa técnica permite avaliar o estresse com mais precisão e de maneira não destrutiva, estudando o comportamento do fotossistema II (FSII) devido a sua sensibilidade (STRASSER & TSIMILLI-MICHAEL, 2001; SWAIN et al., 2010).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do nível de luz durante a aclimatização no estabelecimento *ex vitro* da bromélia *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith por meio de análises dos comportamentos fotossintéticos e de crescimento.

## **Material e Métodos**

### **Cultivo *in vitro***

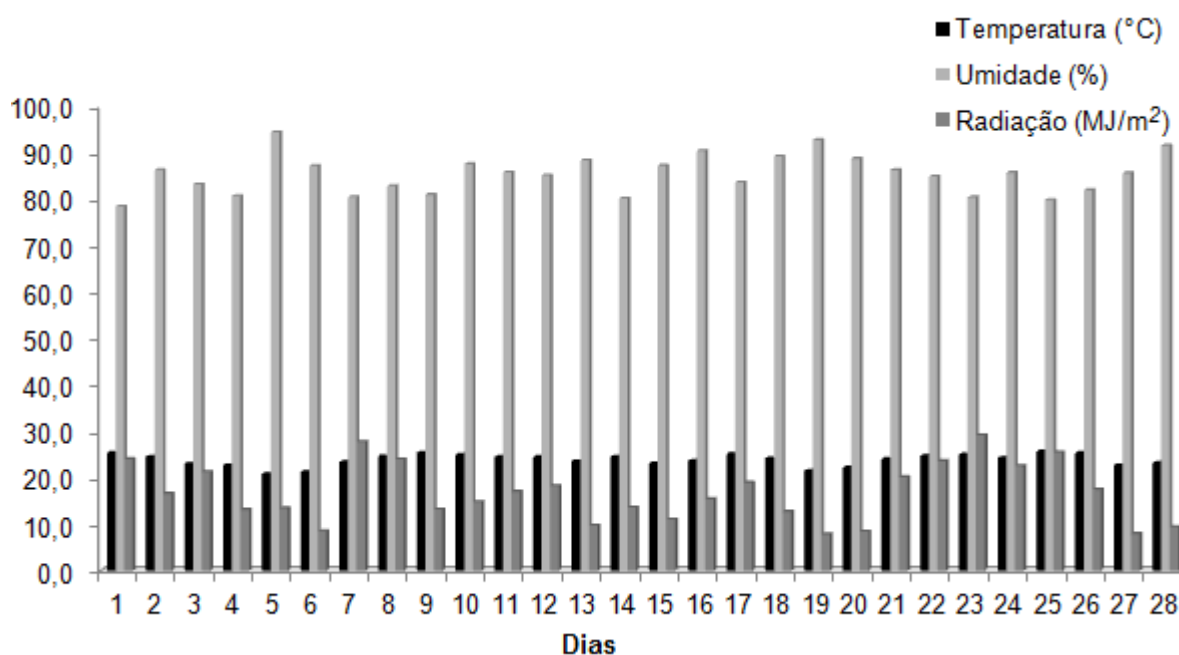
O estabelecimento de plantas de *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith foi realizado a partir de sementes coletadas de frutos de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação. A desinfestação das sementes foi feita em etanol 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos, com posterior

lavagem por três vezes em água destilada autoclavada e inoculação em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da concentração original, suplementado com 58,44 mM de sacarose e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. As plantas obtidas foram inoculadas em meio MS líquido estacionário suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 58,44 mM de sacarose e 15,0 µM de 6-benzilaminopurina. Após 80 dias de cultivo, as brotações formadas foram subcultivadas por 45 dias em frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio MS líquido estacionário isento de fitorreguladores e suplementado com 58,44 mM de sacarose. A última fase de cultivo *in vitro* consistiu na individualização dos brotos e indução do enraizamento em meio MS solidificado com 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 58,44 mM de sacarose e 3,0 µM de ácido naftaleno-acético. O pH de todos os meios foram ajustados em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento a 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos.

### **Condições de aclimatização**

Após 60 dias em meio de cultivo para indução do enraizamento *in vitro*, as mudas de *N. concentrica* foram plantadas em bandejas plásticas com células individuais contendo substrato vermiculita expandida tipo C e acondicionadas em caixas cobertas com plástico transparente de polietileno visando à manutenção da elevada umidade relativa do ar. O substrato permaneceu com umidade constante ao nível da capacidade de campo.

Os tratamentos consistiram no cultivo *ex vitro* das plantas nos níveis de luz 30%, 50%, 70% utilizando malhas pretas de polietileno, tipo de sombrite, e pleno sol (100% de luz). Os dados meteorológicos durante o período experimental foram obtidos por meio da estação meteorológica montada ao lado do experimento (Figura 1).



**FIGURA 1.** Valores médios dos dados climáticos do período experimental.

#### **Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (O-J-I-P) e teste JIP**

As medidas da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* foram realizadas aos 0 (*in vitro*), 7, 14, 21 e 28 dias de aclimatização, entre 8:00 e 9:00 horas, utilizando fluorômetro portátil HandyPEA (Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK) em cinco plantas de *N. concentrica* por tratamento, sendo usada a terceira folha completamente expandida a partir da base. Previamente às leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro utilizando-se clips foliares por 30 minutos, período para oxidação completa do sistema fotossintético. Em seguida, foi emitido um flash de luz, proporcionando um pulso de irradiância saturante de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons nas folhas, com duração de 1 s. A intensidade da fluorescência foi medida em 50, 100, 300  $\mu\text{s}$ , 2, 30 ms e a 1 s. A partir da fluorescência transiente OJIP foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP com auxílio do software Biolyzer (Laboratório de Bioenergética, Universidade de Genebra, Suíça). A interpretação e normalizações dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste foram de acordo com STRASSER & STRASSER (1995).

### **Análise de caracteres de crescimento**

Aos 28 dias de aclimatização, 25 plantas por tratamento foram coletadas aleatoriamente e divididas em cinco parcelas. O número de folhas, massa fresca da parte aérea (g), massa fresca do sistema radicular (g), massa fresca total (g), massa seca da parte aérea (g), massa seca do sistema radicular (g), massa seca total (g) e área foliar ( $\text{cm}^2$ ) foram determinados. Para esta última análise, foram feitas fotografias milimetradas das folhas e com auxílio do software ImageJ<sup>®</sup> foram realizadas as medições.

### **Análise estatística**

Para as análises referentes ao teste JIP adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (quatro níveis de luz: 30%; 50%; 70% e 100% x quatro tempos: 0, 7, 14, 21 e 28 dias) composto de cinco repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

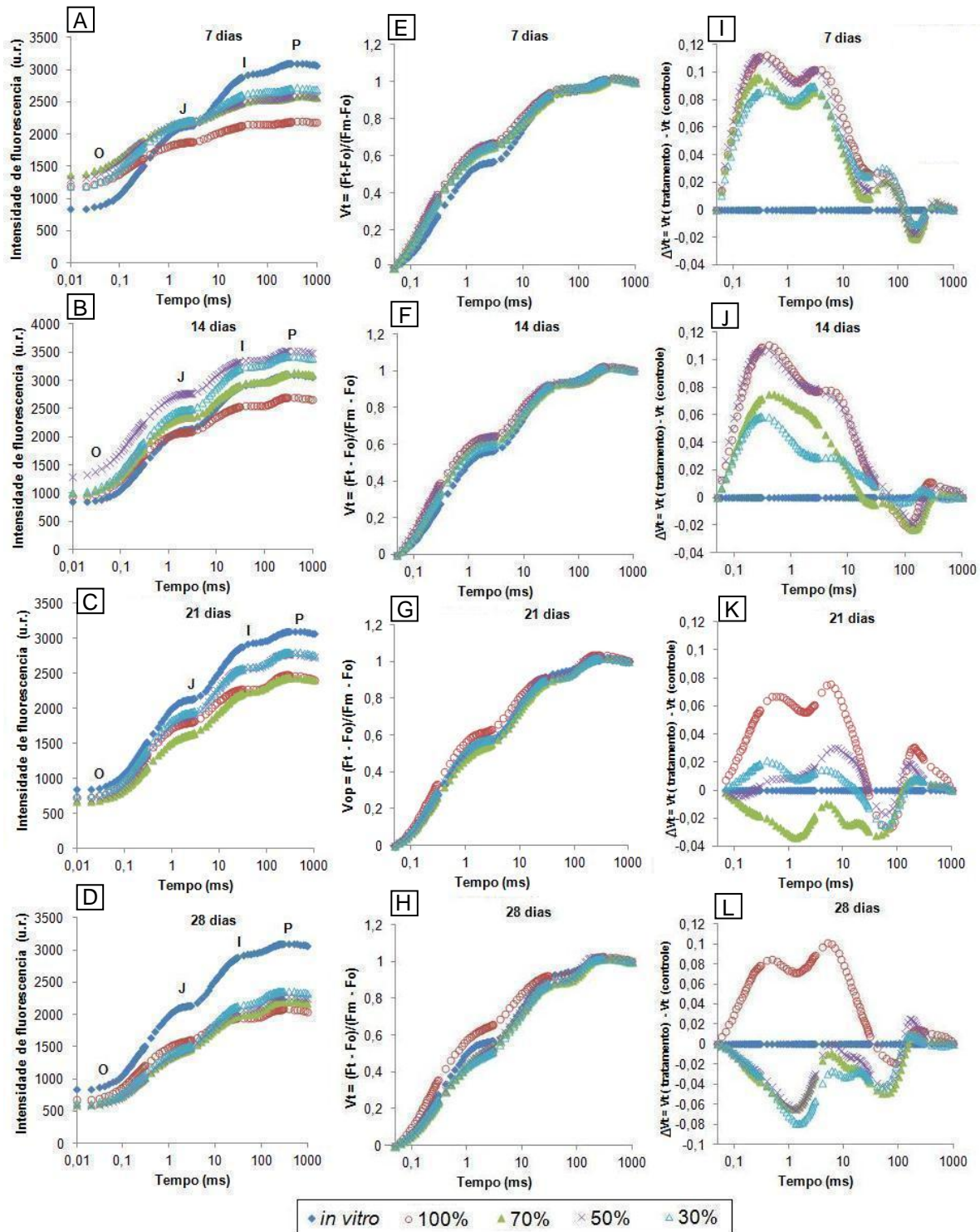
Para as análises dos caracteres de crescimento adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado para os quatro níveis de luz (30%; 50%; 70% e 100%) ao final de 28 dias de aclimatização. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de regressão.

## **Resultados e discussão**

### **Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (O-J-I-P) e teste JIP**

A fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas de *Neoregelia concentrica* durante a aclimatização foi registrada entre 10  $\mu\text{s}$  e 1 s e apresentada em escala logarítmica (Figura 2). As plantas mantidas a pleno sol (100% da luz) a partir de 14 dias de aclimatização e as aquelas cultivadas com redução do nível de luz em 30%, 50% e 70% durante todo tempo de avaliação, exibiram comportamento típico polifásico com aumento da magnitude dos sinais de fluorescência desde um nível basal ( $F_0$ ) até um nível máximo ( $F_m$ ) com os pontos intermediários J e I bem definidos (Figura 1A-D), demonstrando que as amostras foram fotossinteticamente ativas (YUSUF et al., 2010). Estes pontos evidenciaram três fases distintas (O-J, J-I e I-P), refletindo os processos de redução da cadeia transportadora de elétrons (SCHANKER et al., 2005). A fase O-J, refere-se à redução do lado acepor do

fotossistema II (FSII); a fase J-I evidencia a excitação do FSII até redução do *pool* de plastoquinonas (JOLIOT & JOLIOT, 2002; TÓTH et al., 2007) e a fase I-P, refere-se à transferência dos elétrons para fotossistema I (FSI) (YUSUF et al., 2010).



**FIGURA 2.** Fluorescência transiente da clorofila *a* de *Neoregelia concentrica* no cultivo *in vitro* e durante a aclimatização em função do nível de luz. (A-D) Intensidade de fluorescência ( $F_t$ ); (E-H) Fluorescência variável relativa; (I-L) Diferença cinética da fluorescência variável relativa.

Nas plantas a pleno sol (100% de luz) com decréscimo da curva a partir do ponto J (Figura 2A), aos 7 dias de aclimatização foi verificada supressão nos pontos I e P com decréscimo considerável na área acima da curva de emissão de fluorescência em todos os tratamentos. A diminuição nos pontos - J, I e P - pode ser atribuída à inibição do transporte de elétrons no lado doador do FSII (GOVINDJEE, 1995) ou ao decréscimo no tamanho do *pool* de plastoquinona A ( $Q_A$ ), que resulta no bloqueio parcial do fluxo de energia (MEHTA et al., 2010).

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi maior nas plantas aos 7 e 14 dias de aclimatização em relação ao controle (*in vitro*) em todos os tratamentos de luz empregados (Figura 2A e B). No entanto, após esse período de aclimatização, os valores de  $F_0$  decresceram gradualmente em função do tempo independente do nível de luz. A partir dos 21 dias de aclimatização, verificou-se redução da  $F_0$  em todos os tratamentos em relação ao  $F_0$  obtido na condição inicial *in vitro* (Figura 2C e D). O aumento em  $F_0$  pode ser atribuído à inibição da transferência de elétrons da  $Q_A$  para a plastoquinona B ( $Q_B$ ), o que indica a ocorrência de danos na proteína D1 do centro de reação do FSII (DIAS & MARENCO, 2006). Esse aumento em  $F_0$  tem sido documentado como um dos sinais mais diretos de fotoinibição em plantas (ARO et al., 1993). Por outro lado, decréscimos em  $F_0$  representam a reativação do centro de reação FSII foto-danificado ou inativado pela irradiação (DIAS & MARENCO, 2006).

Reduções nos valores da fluorescência máxima ( $F_m$ ) foram verificados aos sete dias de aclimatização em todos os tratamentos, sendo menor nas plantas cultivadas a pleno sol (100% de luz) (Figura 2A). Aos 14 dias foi observado aumentos nos valores de  $F_m$  nos tratamentos com redução parcial de luz (30%, 50% e 70%), diferentemente das plantas cultivadas a pleno sol, para as quais os valores de  $F_m$  permaneceram reduzidos em relação à condição *in vitro* (Figura 2B). A partir dos 21 dias de aclimatização,  $F_m$  apresentou decréscimo gradual em todos os tratamentos, e após 28 dias de aclimatização, os valores médios de  $F_m$  foram semelhantes entre os tratamentos e menores do que aqueles observados para a condição *in vitro* (Figura 2C e D).

Resultados semelhantes foram verificados em plantas de *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy propagadas *in vitro*, em que  $F_m$  decresceu após a transferência das plantas para a condição *ex vitro* seguida de recuperação, com valores médios



da  $F_m$  inferiores ao final de 35 dias de aclimatização em relação à condição inicial *in vitro* (YANG & YEH, 2008). Declínios em  $F_m$  estão frequentemente associados a um mecanismo fotoprotetor, devido a reações que conduzem à dissipação de energia não-fotoquímica (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1992).

Quando analisada a fluorescência relativa [ $V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$ ], todas as plantas apresentaram incremento no ponto J aos sete dias de aclimatização (Figura 2E) com redução gradativa em função desse tempo, sendo menores que o controle nos tratamentos com redução parcial da luz (30%, 50% e 70%) aos 28 dias de aclimatização (Figura 2H). Nas plantas de *N. concentrica* cultivadas a pleno sol não foi verificada redução no ponto J ao longo da aclimatização o que foi evidente em todas as avaliações (Figura 2E-H).

O ponto J ocorre aproximadamente a 2 ms e está relacionado com o fechamento parcial de unidades fotossintéticas do centro de reação no FSII. Sendo assim, esse parâmetro está diretamente envolvido com as mudanças constantes na transferência de elétrons da  $Q_A^-$  para  $Q_B$  (STRASSER et al., 2010; VREDENBERG, 2000). Quando as plantas estão sujeitas ao estresse pelo aumento da incidência de luz, o ponto J pode tornar-se mais pronunciado (GONÇALVES et al., 2010). Essa inflexão no ponto J representa uma dupla redução dos transportadores de elétrons feofitina,  $Q_A$  e  $Q_B$  (STRASSER et al., 2004; LAZÁR, 2006) e é proporcional ao aumento da luz (ESSEMINÉ et al., 2012).

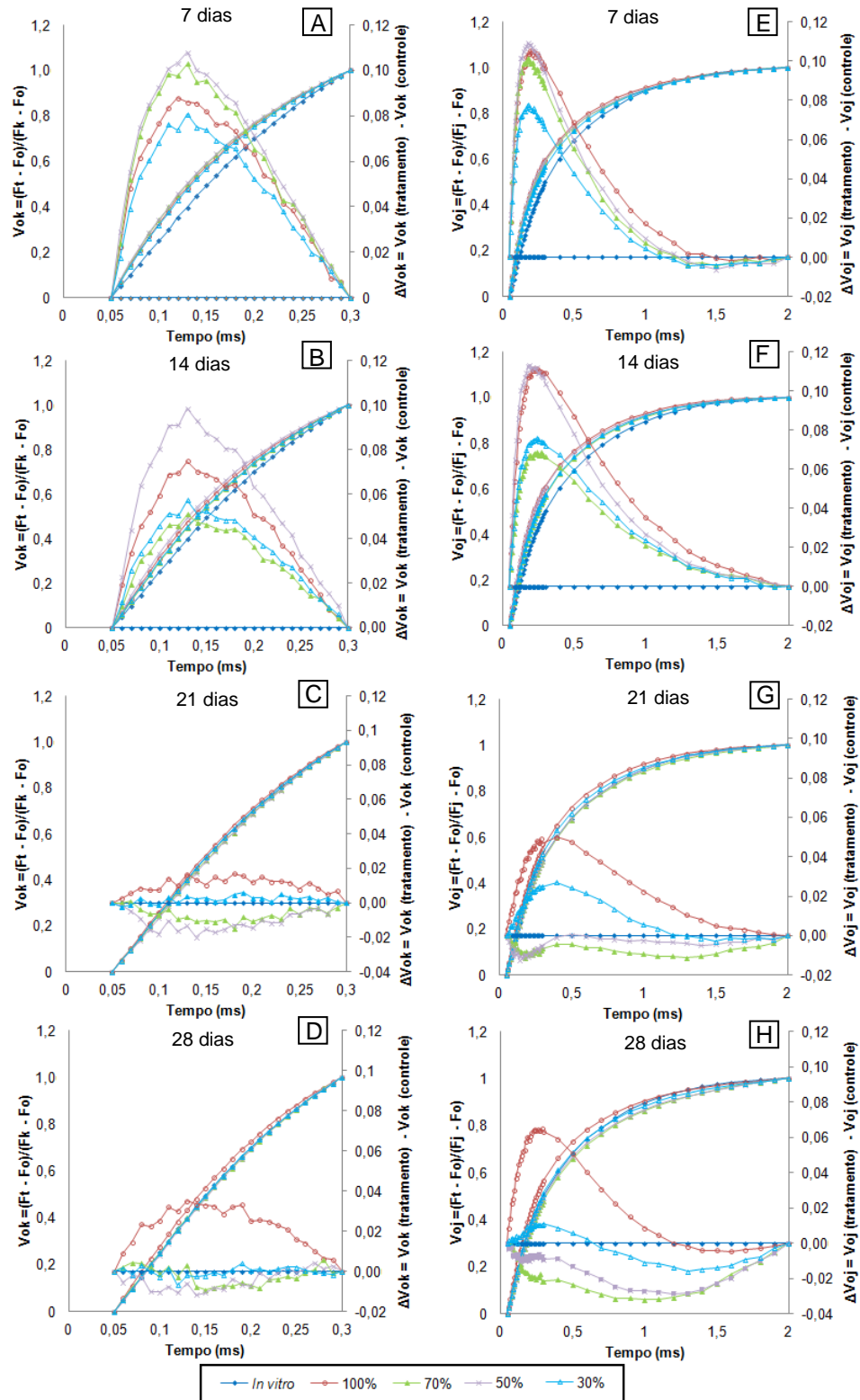
Diferente do ponto J, para o ponto I não foram observadas alterações pronunciadas (Figura 2E-H). Isso é devido às vias dissipativas distintas que conduzem ao fechamento completo do centro de reação FSII no ponto I no qual as alterações são relacionadas a eventos que ocorrem antes da redução do *pool* de plastoquinonas (BOISVERT et al., 2006).

As curvas das diferenças da cinética da fluorescência relativa (entre 50µs e 1s) em relação ao controle [ $\Delta V_t = V_{(tratamento)} - V_{(controle)}$ ] mostraram comportamentos distintos em função do tempo nos tratamentos de aclimatização com desvios positivos entre as fases O-J e J-I aos 7 e 14 dias de aclimatização (Figura 2I e J). Aos 21 dias, o desvio O-J se tornou negativo nas plantas cultivadas com 50% e 70% de luz, sendo o desvio J-I também negativo no tratamento com redução da luz em 70% (Figura 2K). Os desvios de ambas as fases foram negativos aos 28 dias de aclimatização nas plantas cultivadas com 30%, 50% e 70% de luz (Figura 2L), diferente do observado no tratamento a sol pleno (100 % de luz), o qual apresentou

desvios positivos em todas as avaliações realizadas (Figura 2I-L). Este resultado mostra que altos níveis de luz durante a aclimatização de *N. concentrica* danificam o aparato fotossintético, levando a uma possível redução no *pool* de aceptores de elétrons e bloqueio parcial do fluxo de energia. A soma das amplitudes de O-J e J-I representam a redução completa de  $Q_A$  (BOISVERT et al., 2006; GAUTHIER et al., 2010), sendo a fase de O-J relacionada com a redução inicial de  $Q_A$  (ZHU et al., 2005) e o seu aumento associado a uma taxa mais lenta de transferência de elétrons entre  $Q_A$  e  $Q_B$  (BOISVERT et al., 2006; GAUTHIER et al., 2010).

A fluorescência relativa entre os pontos O (50 $\mu$ s) - K (300  $\mu$ s) e O (50 $\mu$ s) - J (2 ms) foram normalizados e as diferenças cinéticas entre os mesmos [ $\Delta V_{OK} = V_{OK(\text{tratamento})} - V_{OK(\text{controle})}$ ] e [ $\Delta V_{OJ} = V_{OJ(\text{tratamento})} - V_{OJ(\text{controle})}$ ] mostradas na Figura 3. Essas análises permitem a visualização das bandas L e K. Verificou-se presença da banda L (aproximadamente em 0,15 ms) e K (ao redor de 0,3 ms) positiva em todos os tratamentos aos 7 e 14 dias de aclimatização (Figura 3A-B e 3E-F). Contudo, houve decréscimo gradual dos valores dessas bandas ao longo da aclimatização, e aos 21 dias de aclimatização as bandas L e K apresentaram-se negativas nos tratamentos com redução da luz em 30% e 50% (Figura 3C-D e 3G-H). Esses resultados evidenciam a recuperação da conectividade entre as unidades do FSII nesses tratamentos. Aos 21 dias, as plantas cultivadas com redução da luz em 30% tiveram as bandas positivas (Figura 3C e 3G), diferente do observado aos 28 dias de aclimatização, que apresentou banda L negativa e banda K positiva (Figura 3D e 3H).

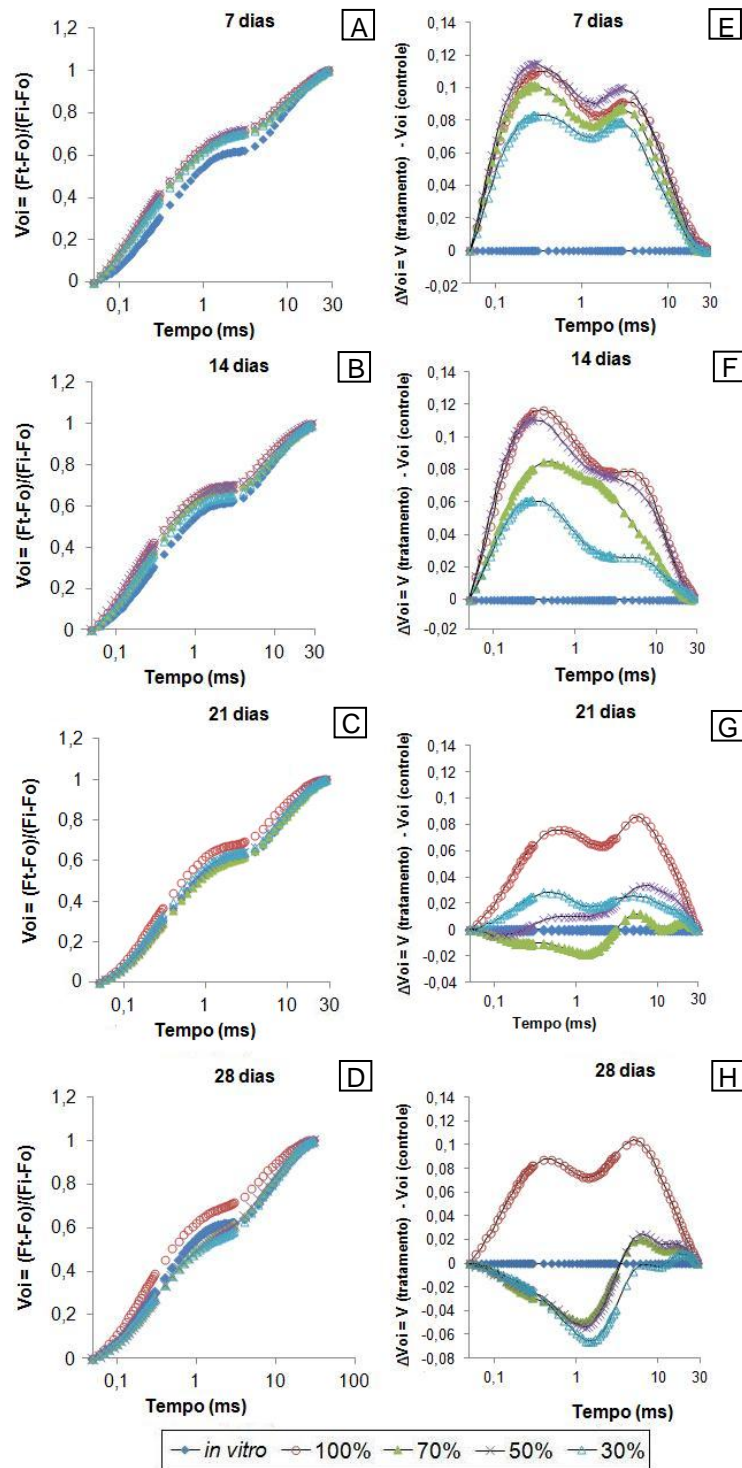
Por outro lado, nas plantas cultivadas em sol pleno (100% de luz), observou-se diminuição das bandas L e K com o decorrer do tempo de aclimatização, porém elas permaneceram positivas em todas as avaliações (Figura 3A-H), mostrando que a alta intensidade luminosa prejudica o processo de aclimatização das plantas de *N. concentrica* propagadas *in vitro*, pois causa danos ao aparato fotossintético, levando ao desempilhamento de tilacóides, com consequente redução na absorção de energia e conectividade entre os as unidades do FSII (OUKARROUM et al., 2007).



**FIGURA 3.** Fluorescência transiente da clorofila *a* entre os pontos O-J e J-I de *Neoregelia concentrica* no cultivo *in vitro* e durante a aclimatização em função do nível de luz. (A-D) Fluorescência variável [ $V_{ok} = (F_t - F_o)/(F_k - F_o)$ ] e diferença cinética de  $V_{OK}$  [ $\Delta V_{OK} = V_{OK(\text{tratamento})} - V_{OK(\text{controle})}$ ], evidenciando a banda L; (E-H) Fluorescência variável [ $V_{oj} = (F_t - F_o)/(F_j - F_o)$ ] e diferença cinética de  $V_{OJ}$  [ $\Delta V_{OJ} = V_{OJ(\text{tratamento})} - V_{OJ(\text{controle})}$ ], evidenciando a banda K.

Quando as plantas não estão sob condição de estresse, não se verifica desvio positivo nas bandas L e K (TOMEK et al., 2001; OUKARROUM et al., 2007). A presença da banda L positiva revela que a conectividade e a transferência energética entre as unidades do FSII são reduzidas, resultando em diminuição na utilização da energia de excitação e uma maior estabilidade do sistema (YUSUF et al, 2010). A alta conectividade resulta na melhor utilização da energia de excitação e melhor estabilidade do sistema (STRASSER et al., 2004). Já a presença de banda K positiva reflete uma inativação do complexo de evolução do oxigênio e/ou um aumento do tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al., 2010). Quanto maior a amplitude dessa banda, maior é a inativação do complexo de evolução de oxigênio (ADAMSKI et al., 2011).

A avaliação da fase O-I foi realizada pela normalização das curvas transiente como fluorescência variável relativa [ $V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$ ], sendo na Figura 4A-D apresentados os valores  $V_{OI} < 1$  e na Figura 4E-H as subtrações [ $\Delta V_{OI} = V_{OI}(\text{tratamento}) - V_{OI}(\text{controle})$ ]. Essa normalização entre os passos O e I distingue a sequência de eventos a partir da captura do éxciton pelo FSII até a redução da plastoquinona (PQ) (PERBONI et al., 2012). Aos 7 e 14 dias de aclimatização foi verificada presença de desvio positivo na fase O-I em todos os tratamentos, demonstrando efeito do estresse nas fases iniciais de cultivo *ex vitro*, indicando provavelmente uma limitação na redução do acceptor final de elétrons do FSII, a plastoquinona. Aos 21 dias de aclimatização verificou-se redução da amplitude do desvio em todos os tratamentos, sendo negativo nas plantas cultivadas com 70% de luz, semelhante ao observado aos 28 dias de aclimatização em todas as plantas cultivadas com redução parcial da luz (30%, 50% e 70%). Analogamente aos resultados descritos para as bandas L e K, apenas as plantas mantidas sob sol pleno (100%) permaneceram com as curvas positivas durante todo tempo de avaliação, mostrando que a alta intensidade luminosa induz ao estresse e prejudica o processo de aclimatização das plantas de *N. concentrica* propagadas *in vitro*. Esse estresse evidenciado pela curva indica que houve danos nos processos que envolvem a captura do éxciton até a redução da PQ (ADAMSKI et al, 2011).



**FIGURA 4.** Fluorescência transiente da clorofila *a* entre os pontos O (50  $\mu$ s) e I (30 ms) de *Neoregelia concentrica* no cultivo *in vitro* e durante a aclimatização em função do nível de luz. (A-D) Fluorescência variável [ $V_{oi} = (F_t - F_o)/(F_i - F_o)$ ]; (E-H) Diferença cinética de  $V_{oi}$  [ $\Delta V_{oi} = V_{oi}(\text{tratamento}) - V_{oi}(\text{controle})$ ].

Na interpretação dos parâmetros do Teste JIP, originados a partir da cinética de emissão de fluorescência, foi possível verificar diferenças significativas em função do nível de luz e tempo de aclimatização, porém estes fatores influenciaram independentemente (Tabela 1). O teste JIP fornece informações relevantes na análise do comportamento do FSII sob estresse ambiental (APPENROTH et al., 2001; HAN et al., 2007).

**TABELA 1.** Parâmetros do Teste JIP, em função do nível de luz e tempo de aclimatização, obtidos a partir da fluorescência transiente da clorofila *a* de *Neoregelia concentrica*.

Variáveis	Nível de luz (%)			
	30	50	70	100
ABS/RC	3,327 b	3,672 ab	3,830 ab	4,083 a
TR <sub>0</sub> /RC	2,133 ab	2,139 ab	2,069 b	2,247 a
ET <sub>0</sub> /RC	0,925 a	0,906 a	0,908 a	0,906 a
DI <sub>0</sub> /RC	1,177 a	1,507 a	1,465 a	1,713 a
φPo	0,662 a	0,634 ab	0,641 ab	0,603 b
φEo	0,295 a	0,281 ab	0,295 a	0,247 b
φRo	0,071 ab	0,066 ab	0,076 a	0,065 b
PI <sub>(ABS)</sub>	6,968 a	6,190 ab	7,138 a	4,344 b
PI <sub>(ABS)total</sub>	2,351 a	1,955 ab	2,468 a	1,516 b

Variáveis	Tempo de aclimatização (dias)				
	0	7	14	21	28
ABS/RC	2,893 c	5,746 a	3,908 b	2,979 c	2,788 c
TR <sub>0</sub> /RC	1,943 b	2,365 a	2,344 a	2,068 b	2,017 b
ET <sub>0</sub> /RC	0,880 b	0,848 b	0,912 ab	0,915 ab	0,996 a
DI <sub>0</sub> /RC	0,779 b	3,381 a	1,470 b	0,880 b	0,814 b
φPo	0,696 a	0,443 c	0,620 b	0,701 a	0,716 a
φEo	0,319 ab	0,161 d	0,248 c	0,321 b	0,358 a
φRo	0,068 c	0,037 d	0,063 c	0,082 b	0,097 a
PI <sub>(ABS)</sub>	8,681 a	1,202 b	3,736 b	7,324 a	9,859 a
PI <sub>(ABS)total</sub>	2,346 b	0,349 d	1,304 c	2,698 b	3,667 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha, em cada fator, não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ABS/RC = Fluxo de absorção por centro de reação; TR<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia capturado por centro de reação no t=0; ET<sub>0</sub>/RC = Fluxo de transporte de elétrons por centro de reação no t=0; DI<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia dissipada por centro de reação no t=0; φPo = Rendimento quântico máximo fotoquímico primário em t=0; φEo = Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> para o intersistema de aceptores de elétrons; φRo = Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> para oceptor final de elétrons do FSI; PI<sub>(ABS)</sub> = Índice de performance na base de absorção; PI<sub>(ABS)total</sub> = Índice de performance total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI.

Os parâmetros que descrevem os fluxos específicos (fluxos por centro de reação do FSII) sofreram alterações gradativas no decorrer da aclimatização (Tabela 1). Após sete dias de aclimatização, aumentos no fluxo de absorção (ABS/RC) e de

captura pelo centro de reação ( $TR_0/RC$ ) foram observados, sendo maior durante toda a aclimatização nas plantas cultivadas a pleno sol (100% de luz). Todavia, esse aumento em  $ABS/RC$  e  $TR_0/RC$  foi acompanhado pelo aumento significativo da dissipação por centro de reação ativo ( $DI_0/RC$ ) aos sete dias, com posterior decréscimo gradativo de  $DI_0/RC$  no decorrer do tempo de aclimatização (Tabela 1).

O aumento de  $ABS/RC$  e  $TR_0/RC$  acompanhado pelo aumento da dissipação de energia ( $DI_0/RC$ ) nos primeiros dias de aclimatização sugere um mecanismo de fotoproteção das plantas e também foi observado em *Solanum nigrum* L. durante a aclimatização (SWAIN et al., 2010).

O fluxo de transporte de elétrons ( $ET_0/RC$ ) apresentou incremento em função do tempo de aclimatização independente do nível de luz, com valores superiores aos 28 dias de aclimatização em relação aos 0 (*in vitro*) e 7 dias. Esse parâmetro representa a taxa de reoxidação de  $Q_A^-$  e o seu aumento indica que houve aproveitamento da energia luminosa combinada com menor taxa de dissipação de energia ( $DI_0/RC$ ) (STRASSER et al., 2004).

A  $\phi Po = F_v/F_m = TR_0/ABS$  apresentou diferenças significativas em função do tempo de aclimatização, com decréscimo após sete dias de aclimatização em relação aos valores das plantas nas condições *in vitro*. Entretanto, os valores de  $\phi Po$  foram totalmente recuperados após 21 dias de aclimatização permanecendo constantes até o final do experimento (Tabela 1). Alterações similares em  $\phi Po$  foram relatadas em *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy durante a aclimatização (YANG & YEH, 2008). Contudo, esse padrão não é comum em todas as espécies, como verificado por Cassana et al. (2010) com plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L. cv. ILS19) propagadas *in vitro*, as quais não tiveram decréscimo dos valores da  $F_v/F_m$  nas fases iniciais da aclimatização.

Quando se comparou os níveis de luz, observaram-se menores valores de  $\phi Po$  nas plantas cultivadas sob sol pleno (100% de luz), contrariamente ao verificado nas plantas cultivadas sob 30% de luz, as quais foram caracterizadas pelo menor declínio da  $\phi Po$  em relação à condição de cultivo inicial (*in vitro*) (Tabela 1). Nesse sentido, a menor luminosidade é eficiente nos primeiros dias de aclimatização provavelmente por reduzir os efeitos do estresse luminoso nas plantas. A queda brusca nos valores de  $\phi Po$  logo após transferência das plantas para o ambiente de luz plena é coerente com o fato de plantas cultivadas sob menor irradiância serem sensíveis à fotoinibição (KITAO et al., 2000).

Na ausência de estresse ambiental, os valores de  $\phi Po$  podem variar numa faixa de 0,75 a 0,85 (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989). Portanto, as reduções observadas nos valores de  $\phi Po$  constituem um excelente indicador de danos fotoinibitórios quando as plantas estão submetidas a qualquer tipo de estresse e pode representar tanto uma regulação fotoprotetora reversível ou uma inativação irreversível do FSII (ARAÚJO & DEMINICIS, 2009).

O rendimento quântico de transporte de elétrons de  $Q_A^-$  para o intersistema de aceptores de elétrons ( $\phi Eo = ET_o/ABS$ ) e o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI ( $\phi Ro = RE_o/ABS$ ) diminuíram após a transferência das plantas para as condições *ex vitro* (7 dias), sendo verificado o aumento gradativo dos valores durante a aclimatização (Tabela 1). Contudo, houve recuperação de  $\phi Ro$  e  $\phi Eo$  em relação à condição inicial (*in vitro*) a partir dos 14 e 21 dias de aclimatização, respectivamente, sendo observado incremento de 42,6% em  $\phi Ro$  aos 28 dias de aclimatização em comparação as plantas *in vitro*. As plantas cultivadas com redução do nível de luz (30%, 50% e 70%) apresentaram os maiores valores de  $\phi Eo$  e  $\phi Ro$  quando comparadas com as plantas cultivadas a pleno sol (Tabela 1), confirmando assim o estresse induzido pela alta irradiação.

O índice de desempenho fotossintético [ $PI_{(ABS)} = ABS/RC \times \phi Po/(1 - \phi Po) \times \psi Eo/(1 - \psi Eo)$ ] de *N. concentrica* apresentou reduções acentuadas após 7 dias de transferência para o ambiente *ex vitro*, com valores 86,15% menores em relação às plantas na condição inicial (*in vitro*). Com a aclimatização das plantas, observou-se aumentos nos valores de  $PI_{(ABS)}$ , com recuperação total aos 21 dias de aclimatização, sendo maior nas plantas sob 70% de luz (Tabela 1). A diminuição observada nos valores de  $PI_{(ABS)}$  indica efeito de fotoinibição e tais mudanças representam perda de eficiência fotoquímica (THACH et al., 2007), como evidenciado nas fases iniciais de aclimatização que tiveram decréscimo expressivo do  $\phi Po$ , principalmente no tratamento a sol pleno (100%) (Tabela 1).

O índice de performance total [ $PI_{(ABS)total} = ABS/RC \times \phi Po/(1 - \phi Po) \times \psi Eo/(1 - \psi Eo) \times \delta Ro/(1 - \delta Ro)$ ] também apresentou decréscimo significativo aos 7 dias de aclimatização. Todavia, aumentos em  $PI_{(ABS)total}$  foram observados no decorrer do tempo de aclimatização com recuperação a partir dos 21 dias. Aos 28 dias de aclimatização observou-se valores médios de  $PI_{(ABS)total}$  superiores aos das plantas cultivadas *in vitro* (Tabela 1), o que confirma a eficiência dos tratamentos com redução parcial de luz durante a aclimatização de *N. concentrica*. O  $PI_{(ABS)total}$  está



intimamente relacionado ao crescimento e sobrevivência das plantas sob condições de estresse, sendo o decréscimo dos valores desse parâmetro um indicativo de que houve uma tensão negativa sobre o sistema que pode resultar em danos na atividade FSII e FSI (YUSUF et al., 2010).

Os índices de performance ( $PI_{(ABS)}$  e  $PI_{(ABS)total}$ ) expressam potenciais parciais de conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos aceptores de elétrons do intersistema e redução dos aceptores finais do FSI (YUSUF et al., 2010). Esses parâmetros têm sido propostos como os mais eficientes para quantificar o estresse em plantas (STRASSER et al., 2010) e evidenciaram as vantagens na redução de luz nível (30%, 50% e 70%) durante a aclimatização de *N. concentrica*.

### Análise de caracteres de crescimento

Por meio da análise de variância, verificaram-se diferenças significativas em função dos níveis de luz aos 28 dias de aclimatização em *Neoregelia concentrica* para quase todos os caracteres de crescimento, sendo semelhante apenas a massa fresca e seca do sistema radicular (Tabela 2).

**TABELA 2.** Resumo da análise de variância para os caracteres fitotécnicos de *Neoregelia concentrica* aos 28 dias de aclimatização em diferentes níveis de exposição à luz

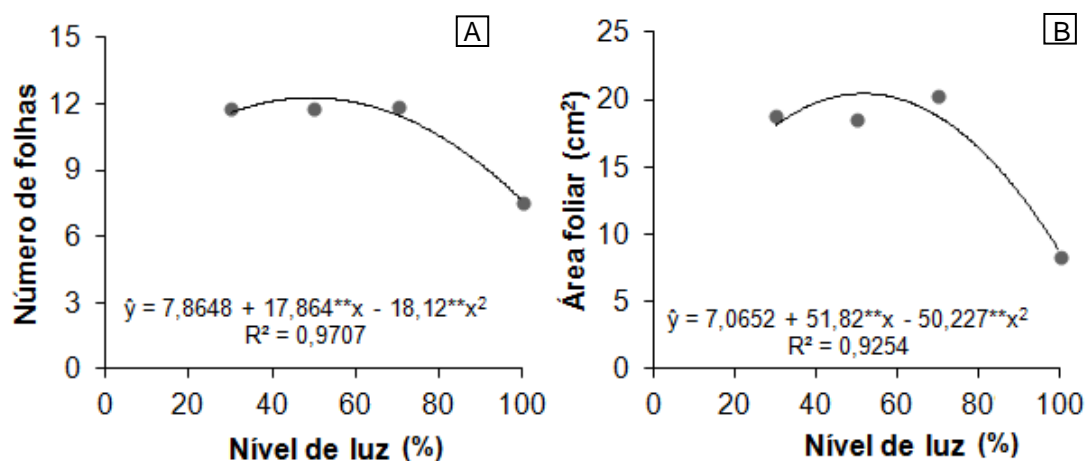
Fontes de variação	Quadrado médio							
	NF	MFA	MFR	MFT	MSA	MSR	MST	AF
Nível de luz	23,05**	0,39**	0,003 <sup>ns</sup>	0,44**	0,03**	0,00 <sup>ns</sup>	0,03**	152**
Erro	0,68	0,01	0,002	0,01	0,00	0,00	0,00	2,00
Média geral	10,74	0,84	0,13	1,02	0,19	0,014	0,21	16,47
C.V. (%)	7,69	9,65	30,31	11,26	10,05	20,56	9,41	8,59

<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F. \*, \*\* Significativo ao nível de 5% e 1% pelo teste F. Número de folhas (NF), massa de matéria fresca da parte aérea (MFA), massa de matéria fresca do sistema radicular (MFR), massa de matéria fresca total (MFT), massa de matéria seca da parte aérea (MSA), massa de matéria seca do sistema radicular (MSR), massa de matéria seca total (MST) e área foliar (AF).

O número de folhas e a área foliar de *N. concentrica* apresentaram comportamento quadrático positivo em função da intensidade luminosa (Figura 5). O aumento da área foliar permite ampliar a superfície fotossintetizante em condições de menor luminosidade (VALLADARES & NIINEMETS, 2008), o que torna a redução da luz a níveis próximos a 50% durante a aclimatização eficiente, pois induz a

formação de folhas mais funcionais na utilização da luz disponível e consequentemente acúmulo de fotoassimilados.

O menor número de folhas e área foliar das plantas de *N. concentrica* cultivadas em pleno sol (100% de luz) se deve principalmente a clorose foliar seguida de necrose. Danos irreversíveis no aparato fotossintético, ocasionados por fotoinibição severa e foto-oxidação, podem reduzir a vida útil das folhas (DIAS & MARENCO, 2006; PALLIOTTI et al., 2009; MICHAEL & KRISHNASWAMY, 2011), como já indicado pela redução nos valores de  $FV/FM = \phi Po$  (Tabela 1), estimativa dos efeitos fotoinibitórios crônicos ocasionadas pelo estresse.

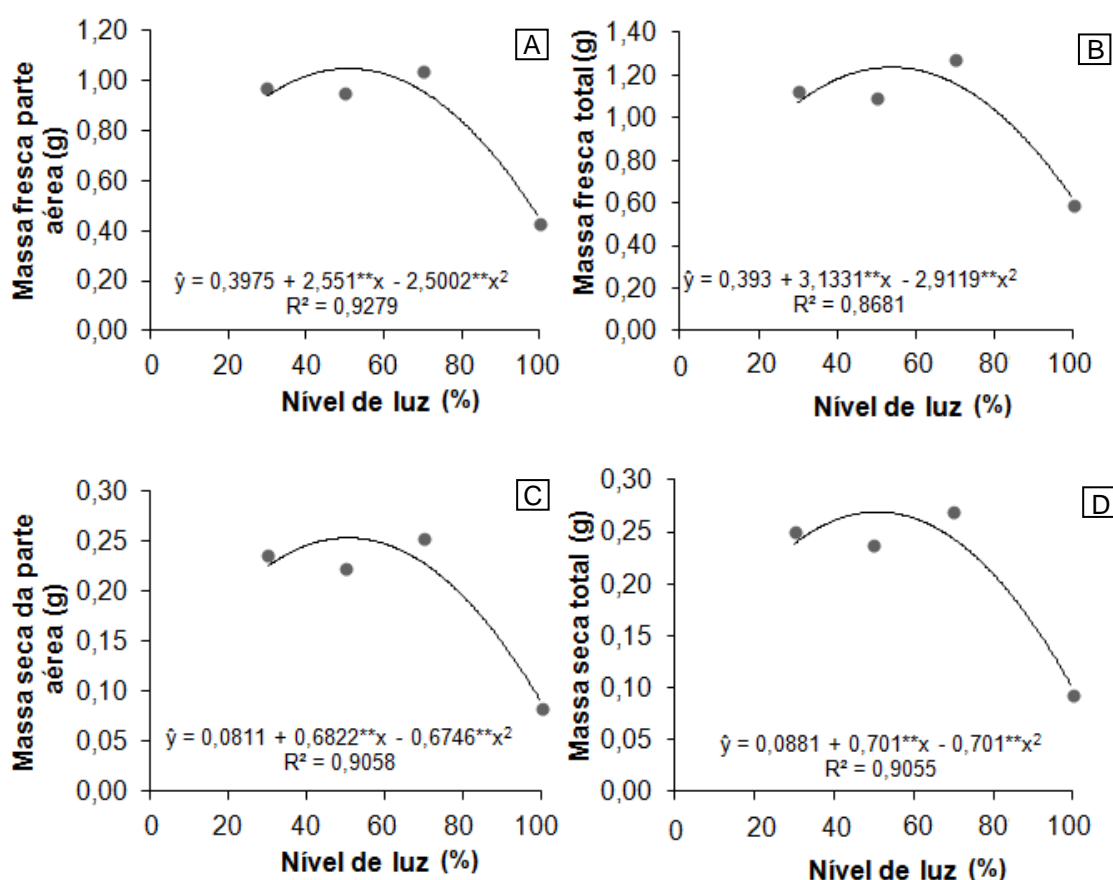


**FIGURA 5.** Número de folhas (A) e área foliar (B) de *Neoregelia concentrica* em função dos níveis de exposição de luz aos 28 dias de aclimatização.

Aos 28 dias de aclimatização, as variáveis relacionadas ao crescimento, devido ao acúmulo de matéria fresca e seca nas plantas de *N. concentrica*, tiveram comportamentos semelhantes com o aumento da luminosidade. A redução da luz em um nível intermediário (50% de luz) propicia a formação de plantas com maior taxa de crescimento, diferente do verificado nas intensidades luminosas extremas testadas (30% e 100%) (Figura 6A-D). Esse maior crescimento das plantas cultivadas sob 50% de luz se deve pela recuperação da conectividade entre as unidades do FSII e pela reativação do complexo de evolução do oxigênio aos 21 dias de aclimatização, mostrado pelas bandas K e L (Figura 3C e 3G), e evidenciado pelos altos valores dos índices de performances ( $PI_{(ABS)}$  e  $PI_{(ABS)total}$ ).

A intensidade de luz é um dos requisitos mais importantes para o crescimento das plantas (WANG et al., 2007). Todavia, sob alta irradiação, as

plantas podem absorver energia luminosa em excesso, resultando na perda da eficiência fotoquímica, causando efeitos prejudiciais no crescimento vegetal (ARAÚJO & DEMINICIS, 2009). Segundo Kitao et al. (2000), a exposição prolongada a altas irradiâncias pode ser prejudicial às plantas, podendo ter como consequência a fotoinibição ou, mesmo, a morte da planta. Em contraste, sob baixa irradiância, o ATP produzido é insuficiente para permitir a fixação do carbono e a biossíntese de carboidratos, o que leva a um menor crescimento das plantas (DAI et al., 2009).

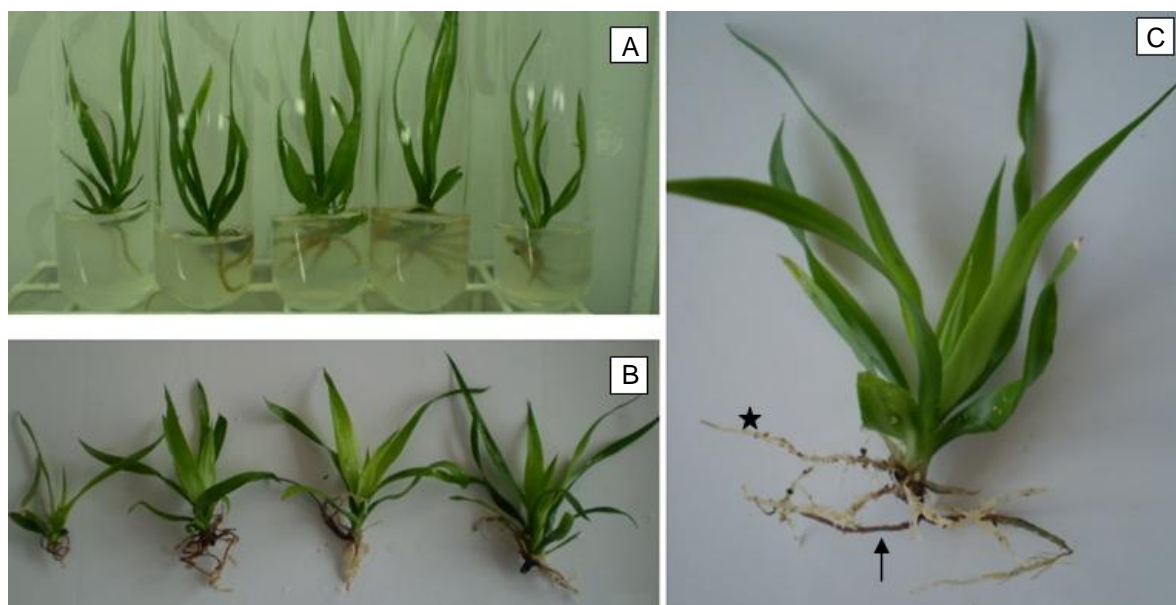


**FIGURA 6.** Massa da matéria fresca parte aérea (A), matéria fresca total (B), matéria seca parte aérea (C) e matéria seca total (D) de *Neoregelia concentrica* em função do nível de exposição de luz aos 28 dias de aclimatização.

A massa da matéria fresca e seca do sistema não apresentaram diferenças significativas em função do nível de luz, com médias de 0,13 g e 0,014 g, respectivamente. Todavia, foi possível verificar a formação de novas raízes na base das plantas de *N. concentrica* aos 28 dias de aclimatização e com diferenças morfológicas em relação às raízes formadas *in vitro*. O sistema radicular formado *in vitro* era mais frágil e não apresentava ramificações, diferente do averiguado nas

novas raízes formadas nas condições *ex vitro*, os quais foram mais resistentes e apresentaram crescimento de raízes secundárias (Figura 7).

As raízes induzidas *in vitro* podem ser importantes na reserva de carboidratos, como verificado na bromélia *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith (CHU et al., 2010). Contudo, as raízes emitidas *in vitro* podem ser pouco funcionais, quando se refere à absorção de água e sais minerais, após a transferência para as condições *ex vitro* (OLIVEIRA et al., 2010), sendo fundamental a emissão de novas raízes (HAZARIKA, 2006). A formação de novas raízes nas condições *ex vitro* pode ser explicado devido a fatores abióticos, como a luz que estimula a emissão de raízes por meio de sua qualidade ou quantidade espectral, como por exemplo, os níveis de irradiância que interferem no acúmulo de fotoassimilados (HUANG et al., 2011a).



**FIGURA 7.** Aspectos visuais de plantas de *N. concentrica* aos 0 (*in vitro*) e 28 dias de aclimatização. A – Condição *in vitro*; B – Aos 28 dias de aclimatização em função do nível de luz (100%; 30%; 50% e 70%; da esquerda para direita); C – Detalhe da morfologia da raiz formada *in vitro* (seta) e *ex vitro* (estrela).

## CONCLUSÕES

O nível de luz durante a aclimatização influencia no estabelecimento *ex vitro* de plantas de *Neoregelia concentrica* propagadas *in vitro*, sendo indicada a redução do nível de luz em 50%, por propiciar a recuperação ao estresse em menor tempo e permitir maior taxa de crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKI, J.M. ; PETERS, J.A. ; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M.A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v.168, n.17, p. 2056-2062, 2011.
- APÓSTOLO, N.; BRUTTI, C.; LLORENTE, B. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v.41, n.3, p.307–313, 2005.
- APPENROTH, K.J.; STOCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v.115, n.1, p.49–64, 2001.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n.1, p. 166-173, 2002.
- ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1143, n.2, p.113–134, 1993.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.7, n.4, p.463-472, 2009.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, n.2, p.391-396, 2006.
- BOISVERT, S.; JOLY, D.; CARPENTIER, R. Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetics. **FEBS Journal**, v.273, n.20, p.4770-4777, 2006.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v.3, n.4, p.497-514, 1989.
- BRITO, G.; COSTA, A.; COELHO, C.; SANTOS, C. Large-scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey. **Trees**, v.23, n.5, p.1019–1031, 2009.
- CASSANA, F.F.; FALQUETO, A.R.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n.3, p.167-170, 2010.
- CHU, E.P.; TAVARES, A.R.; KANASHIRO, S.; GIAMPAOLI, P.; YOKOTA, E.S. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in

*Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.125, n.3, p.451–455, 2010.

DAI, Y.; SHEN, Z.; LIU, Y.; WANG, L.; HANNAWAY, D.; LU, H. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.3, p.177–182, 2009.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.

DIAS, D.P.; MARENCO, R.A. Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. **Photosynthetica**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.

ESSEMINI, J.; GOVINDACHARY, S.; JOLY, D.; AMMAR, S.; BOUZID, S. Effect of moderate and high light on photosystem II function in *Arabidopsis thaliana* depleted in digalactosyl-diacylglycerol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.x, n.x, p.xxx-xxx, 2012.

GAUTHIER, A.; JOLY, D.; BOISVERT, S.; CARPENTIER, R. Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor (QA): reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes **Photochemistry Photobiology**, v.86, n.5, p.1064–1070, 2010.

GONÇALVES, J.F.C.; SANTOS JR., U.M.; NINA JR., A.R.; CHEVREUIL, L.R. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings under two irradiance environments. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.19, n.3, p.171-184, 2007.

GONÇALVES, J.F.C.; SILVA, C.E.; GUIMARÃES, D.G.; BERNARDES, R.S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v.40, n.1, p.89-98, 2010.

GOVINDJEE, R. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.131–160, 1995.

HAN, T.; KANG, S.H.; PARK, J.S.; LEE, H.K.; BROWN, M.T. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v.86, n.2, p.176–184, 2008.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, n.2, p.105-120, 2006.

HUANG, P.L.; LIAO, L.J.; TSAI, C.C.; LIV, Z.H.; Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.1, p.73-78, 2011a.

HUANG, P.L.; LIU, Z.H.; CHANG, M.L.; LIAO, L.J. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, v.130, n.4, p.894–898, 2011b.

JOLIOT, P.; JOLIOT, A. Cyclic electron transfer in plant leaf. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.15, p.10209-10214, 2002.

KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T.; TOBITA, H.; MARUYAMA, Y. Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. **Plant, Cell & Environment**, v.23, n.1, p.81-89, 2000.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v.114, n.4, p.525-537, 2001.

LAZÁR, D. The Polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. **Functional Plant Biology**, v. 33, n.1, p.9-30, 2006.

LU, C.; VONSHAK, A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. **Physiologia Plantarum**, v.114, n.3, p.405–413, 2002.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.1, p.16–20, 2010.

MICHAEL, P.I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.74, p.171–177, 2011.

OLIVEIRA, Y.; PINTO, F.; SILVA, A.L.L.; GUEDES, I.; BIASI, L.A.; QUOIRIN, M. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.192-197, 2010.

OSÓRIO, M.L.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* plants in response to different irradiances. **Biologia Plantarum**, v.54, n.3, p.415-422, 2010.

OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.3, p.438–446, 2007.

PERBONI, A.T.; CASSOL, D.; SILVA, F.S.P.; SILVA, D.M.; BACARIN, M.A. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of flooding in canola hybrids. **Biologia**, v.67, n.2, p.338-346, 2012.

SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; SÁEZ, K.L.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M.I.; RÍOS, D.G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between *in vitro* and nursery plants. **Biologia Plantarum**, v.56, n.1, p.15-24, 2012.

SCHANKER, G.; TÓTH, S.Z.; STRASSER, R.J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1706, n.3, p.250-261, 2005.

SEON, J.; CUI, Y.; KOZAI, T.; PAEK, K. Influence of *in vitro* growth on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, n.2, p.171–17, 2000.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. **Measuring fast fluorescence transients to address environ-mental questions**: the JIP-test. In: Mathis P, editor. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 977–80.

STRASSER R. J.; TSIMILLI-MICHAEL M. Stress in plants, from daily rhythm to global changes, detected and quantified by the JIP-test. **Chimie Nouvelle (SRC)**, v.75, p.3321–3326, 2001.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE, (Eds.), **Chlorophyll fluorescence**: A signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p.321-362, 2004.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1797, n.6, p.1313-1326, 2010.

SWAIN, S.S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P.K.; CHAND, P.K. Photosynthetic and transpiration responses of *in vitro*-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.134–141, 2010.

TOMEK, P.; LAZÁR, D.; ILÍK, P; NAUS, J. On intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measure at different intensities of exciting light. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, n.11, p.115-1160, 2001.

TÓTH, S.Z.; SCHANKER, G.; STRASSER, R.J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. **Photosynthesis Research**, v.93, n.1, p.193-203, 2007.

THACH, L.B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v.94, n.2, p.423-436, 2007.



VREDENBERG, W.J. A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in Photosystem II incorporating radical pair recombinations. **Biophysical Journal**, v.79, n.1, p.25-38, 2000.

WANG, H.; WANG, F.L.; WANG, G.; MAJOURHAT, K. The responses of photosynthetic capacity, chlorophyllfluorescence and chlorophyllcontent of nectarine (*Prunus persica* var. *Nectarina* Maxim) to greenhouse and field grown conditions. **Scientia Horticulturae**, v.112, n.1, p.66–72, 2007.

YANG, S.H.; YEH, D.M. *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, n.2 , p.201-207, 2008.

YUSUF, M.M.; KUMAR,D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, N.B.; SARIN. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1797, n.8, p.1428-1438, 2010.

ZHU, X.G.; GOVINDJEE, R.; BAKER, N.R.; deSTURLER, E.; ORT, D.R.;LONG, S.P. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. **Planta**, v.223, n.1, p.114–133, 2005.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas de cultura de tecidos se mostraram eficientes na propagação em larga escala da bromélia *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith. Foi verificada significativa diferença entre a ação dos diferentes tipos e níveis de fitorreguladores sobre a resposta morfogênica nas fases de cultivo estudadas.

Na multiplicação *in vitro* por meio da indução de brotos laterais ocorreu uma maior proliferação de gemas axilares quando os meios foram suplementados com 15  $\mu\text{M}$  de BAP (6-benzilaminopurina), observando maiores médias de emissão de brotos, número de brotos, massa fresca e seca das multibrotações.

Na análise morfofisiológica, o aumento do nível de citocinina induziu maior espessamento dos tecidos foliares internos, com valores superiores quando empregado BAP no meio de cultivo em relação à CIN (cinetina). Esses resultados mostraram que o emprego de 15  $\mu\text{M}$  de BAP é eficiente na propagação *in vitro* de *N. concentrica*, pois agrega uma maior taxa de multiplicação com a formação de plantas com características anatômicas potencialmente importantes para fase de aclimatização.

A resposta rizogênica da espécie estudada também foi distinta quanto ao tipo e nível de auxina empregada. No enraizamento *in vitro* observou-se melhores resultados com ANA (ácido naftaleno-acético) em relação à AIB (ácido indol-3-butírico), sendo indicado o uso de 3  $\mu\text{M}$  de ANA. O mesmo padrão não é verificado no enraizamento *ex vitro*, pois a aplicação de AIB (5  $\mu\text{M}$ ) na base nos brotos foi mais eficiente que ANA na resposta organogênica. Portanto, foi possível observar que não apenas o tipo e nível de auxina influenciaram na resposta organogênica de *N. concentrica*, mas também o método de enraizamento aplicado.

Na aclimatização, compreendida como a transferência das plantas para as condições *ex vitro*, verificou-se grande influência do nível de luz nos aspectos fisiológicos de *N. concentrica* propagadas *in vitro*. A alta irradiância induziu a fotoinibição e baixa taxa de crescimento nas plantas a pleno sol (100% de luz),

diferente do observado quando as plantas foram cultivadas com redução parcial de luz (30%, 50% e 70%). Essas tiveram menores danos no aparato fotossintético, sendo indicada a redução do nível de luz em 50% durante a aclimatização de *N. concentrica*, por permitir rápida recuperação e maior taxa de crescimento das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKI, J.M. ; PETERS, J.A. ; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M.A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v.168, n.17, p. 2056-2062, 2011.
- ALVES, G.M.; VESCO, L.L.D.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v.110, n.2, p.204–207, 2006.
- AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.58, n.1, p.31-37, 1999.
- ANDRADE, F.S.A.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Estudo sobre produção e comercialização de bromélia nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.5, n.2, p.97-110, 1999.
- APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In vitro Cell Developmental Biological Plant**, v.41, n.3, p.307-313, 2005.
- APOSTOLO, N.M.; LLORENTE, B. E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.36, n.4, p.243–249, 2000.
- APPENROTH, K.J.; STOCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v.115, n.1, p.49–64, 2001.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.7, n.4, p.463-472, 2009.
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y.; CASTRO, E.M.; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2506-2511, 2009.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n.1, p. 166-173, 2002.

ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1143, n.2, p.113–134, 1993.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L.A.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, v.11, n.6, p.1081-1089, 2002.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, n.2, p.391-396, 2006.

ATROCH, E.M.A.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.4, p.853-862, 2001.

AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.473-476, 2006.

BALKE, M.; GOMEZ-ZURITA, J.; RIBERA, I.; VILORIA, A.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; GARCIA, M.; HENDRICH, L.; VOGLER, A. P. Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the neotropical forest canopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, v.105, n.17, p.6356-6361, 2008.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.185-194, 2006.

BARFUSS, M.H.J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T.F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v.92, n.2, p.337-351, 2005.

BARRUETO CID, L.P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p.188.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 2000. 689 p.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture**: theory and practice, a revised edition. Studies in Plant Science, v.5, 1996. p.767.

BOISVERT, S.; JOLY, D.; CARPENTIER, R. Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetics. **FEBS Journal**, v.273, n.20, p.4770-4777, 2006.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v.3, n.4, p.497-514, 1989.

BORGES, N.S.S.; BENBADIS, A.K.; MARCO, C.A.; SOMBRA, J.N.S. Avaliação da descontaminação, germinação e respostas morfogênicas do mamão cultivado *in vitro* (*Carica papaya* L.) **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.2, p.308-313, 2006.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.89, n.3, p.195-206, 2001.

BRIGHIGNA, L.; FIORDI, A.C.; PALANDRI, M.R. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. **Phytomorphology**, v.34, p.191-200, 1984.

BRITO, G.; COSTA, A.; COELHO, C.; SANTOS, C. Large-scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey. **Trees**, v.23, n.5, p.1019–1031, 2009.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

BUKATSCH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.

CABRERA, M.; TORRES, Y.; SANTOS, A.; BASAIL, M.; RAYAS, A.; MEDERO, V.; ROBAINA, A.; LÓPEZ, J.; GARCÍA, M.; VENTURA, J.C.; GUTIÉRREZ, V.; OTERO, E.; BAUTA, M.M. Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de Ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). **INIVIT**. v.7, 2003.

CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.4, p.649-653, 2002.

CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, n.2, p.79-83, 1999.

CARVALHO, A.C.P.P.; MERCIER, H. Bromeliaceae. In: TEREIO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; BARROSO, T.C.S.F. (eds.) **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. 2005. p.59-83.

CARVALHO, A.C.P.P.; PINHEIRO, M.V.M.; DIAS, G.M.G.; MORAIS, J.P.S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.1, p.103-108, 2009.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Archivos de Zootecnia**. v.57, n.1, p.13-28, 2008.

CARVALHO JUNIOR, W.G.O.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R. Comprimento da estaca no desenvolvimento de mudas de alecrim-pimenta. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2199-2202, 2009.

CASSANA, F.F.; FALQUETO, A.R.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n.3, p.167-170, 2010.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. 1. ed. Lavras-MG: Editora UFLA, 2009. v.1, 234 p.

CEITA, G.O.; ASSIS, J.G.A.; GUEDES, M.L.S.; OLIVEIRA, A.L.P.C. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.158, n.1, p.189–193, 2008.

CHU, E.P.; TAVARES, A.R.; KANASHIRO, S.; GIAMPAOLI, P.; YOKOTA, E.S. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.125, n.3, p.451–455, 2010.

COSTA, E.; RODRIGUES, E. T.; ALVES, V. B.; SANTOS, L. C. R. dos; VIEIRA, L. C. R. Efeitos da ambiência, recipientes e substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro amarelo em Aquidauana, MS. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.31, n.1, p.236-244, 2009.

DAI, Y.; SHEN, Z.; LIU, Y.; WANG, L.; HANNAWAY, D.; LU, H. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.3, p.177–182, 2009.

DAQUINTA, M.M.; ALMEIDA, A.; GUERRA, M.P. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of Bromeliad Society**, v.49, n.2, p.72-76, 1999.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.

DIAS, D.P.; MARENCO, R.A. Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. **Photosynthetica**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.3, p.780-787, 2009.

DROSTE, A.; SILVA, A.M.; MATOS, A.V.; ALMEIDA, J.W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.5, p.717-722, 2005.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.29, n.58, p.49-59, 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449, 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum' **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.488-490, 2005.

ESSEMINE, J.; GOVINDACHARY, S.; JOLY, D.; AMMAR, S.; BOUZID, S. Effect of moderate and high light on photosystem II function in *Arabidopsis thaliana* depleted in digalactosyl-diacylglycerol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.x, n.x, p.xxx-xxx, 2012.

FERREIRA, C. A.; PAIVA, P. D. de O.; RODRIGUES, T. M.; RAMOS, D. P.; CARVALHO, J. G. de; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p.666-671, 2007.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M. C.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.327-336, 2000.

FRACARO, A.A.; PEREIRA, F.M. Distribuição do sistema radicular da goiabeira 'Rica' produzida a partir de estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.183-185, 2004.

FRÁGUAS, C.B.; DORNELLES, C.M.V.; LIMA, G.P.P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1682-1687, 2009.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.S. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, v.54, n.311, p.63-67, 2007.



GAUTHIER, A.; JOLY, D.; BOISVERT, S.; CARPENTIER, R. Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor ( $Q_A$ ): reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes. **Photochemistry Photobiology**, v.86, n.5, p.1064–1070, 2010.

GONÇALVES, J.C.; DIOGO, G.; COELHO, M.T.; AMÂNCIO, S. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. **Acta Horticulturae**, n.520, p.183-193, 2000.

GONÇALVES, J.F.C.; SANTOS JR., U.M.; NINA JR., A.R.; CHEVREUIL, L.R. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings under two irradiance environments. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.19, n.3, p.171-184, 2007.

GONÇALVES, J.F.C.; SILVA, C.E.; GUIMARÃES, D.G.; BERNARDES, R.S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v.40, n.1, p.89-98, 2010.

GOVINDJEE, R. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.131–160, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.D. **Strategies for the micropropagation of bromeliads**. In: JAIN, S.M., OCHATT, S.J. (Eds.), *Protocols for in vitro Propagation of Ornamental Plants: methods in molecular biology*, v. 589. Humana Press, New York, 2010, p.47–66.

HAN, T.; KANG, S.H.; PARK, J.S.; LEE, H.K.; BROWN, M.T. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v.86, n.2, p.176–184, 2008.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES-JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, New Delhi, v.108, p.105-120, 2006.

HORBACH, M.A.; BISOGNIN, D.A.; KIELSE, P.; QUADROS, K.M.; FICK, T.A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.113-119, 2011.

HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) evidence from molecular and anatomical studies. **Aliso**, v.23, p.27-43, 2007.

HORRES, R; ZIZKA, G.; KAHL, G.; WEISING, K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL* (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. **Plant Biology**, v.2, n.3, p.306-315, 2000.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v.8, n.9, p.453-459, 2003.

HUANG, P-L.; LIAO, L-J.; TSAI, C-C.; LIV, Z-H.; Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.1, p.73-78, 2011a.

HUANG, P.L.; LIU, Z.H.; CHANG, M.L.; LIAO, L.J. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, v.130, n.4, p.894–898, 2011b.

JESUS, A.M.S.; CARVALHO, S.P.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v.11, n.6, p.431-436, 2010.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940, 523p.

JOLIOT, P., JOLIOT, A. Cyclic electron transfer in plant leaf. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.15, p.10209-10214, 2002.

JORGE, L.A.C.; RODRIGUES, A.F.O. Safira: sistema de análise de fibras e raízes. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Instrumentação Agropecuária, n.24, 2008.

KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T.; TOBITA, H.; MARUYAMA, Y. Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. **Plant, Cell & Environment**, v.23, n.1, p.81-89, 2000.

KITTO, S.L. Comercial micropropagation. **HortScience**, v.32, n.6, p.1012-1016, 1997.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v.114, n.4, p.525-537, 2001.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.41-78.

LAKSO, A.N.; REISH, B.I.; MONTENSEN, J.; ROBERTS, M.H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.111, n.4, p.634-638, 1986.

LAMHAMEDI, M.; CHAMBERLAND H.; TREMBLAY. F.M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to in vitro acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v.118, n.4, p.554-561, 2003.

LAZÁR, D. The Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. **Functional Plant Biology**. v. 33, n.1, p.9-30, 2006.

LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C. **Bromélias na natureza**. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro. 1993. 184p.

LOPES, S.C.; LAMEIRA, O.A.; FORTES, G.R.L.; NOGUEIRA, R.C.; PINTO J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v.7, n.1, p.124-128, 2001.

LONE, A.B.; UNEMOTO, L.K.; YAMAMOTO, L.Y.; COSTA, L.; SCHNITZER, J.A.; SATO, A.J.; RICCE, W.S.; ASSIS, M.A.; ROBERTO, S.R. Enraizamento de estacas de azaleia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1720-1725, 2010.

LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. **Trees**, v.17, n.1, p.11-22, 2003.

LU, C.; VONSHAK, A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. **Physiologia Plantarum**, v.114, n.3, p.405–413, 2002.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 10 ed. The Bromeliad Society, Inc., Oregon. 2006.

MACHADO, M.P.; MAYER, J.L.S.; RITTER, M. BIASI, L.A. Indole butyric acid on rooting ability of semihardwood cutting of grapevine rootstock 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.476-479, 2005.

MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SANCHEZ-TAMES, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, n.3, p.207–214, 2000.

MARTINELLI, G. **Reproductive biology Bromeliaceae in the Atlantic rainforest southeastern Brazil**. PhD Thesis, University of St. Andrews, EUA, 1994.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C.M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. da; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.

MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Enraizamento *in vitro* de *Vriesea cacuminis*

L.B.Smith (BROMELIACEAE) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.969-971, 2007.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana**, v.16, p.147-149, 1995.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.2, p.107-112, 2003.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.1, p.16–20, 2010.

MICHAEL, P.I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.74, p.171–177, 2011.

MOLLO, L.; MARTINS, M.C.M.; OLIVEIRA, V.F.; NIEVOLA, C.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C.L. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.1, p.141-149, 2011.

MOURA, E.F.; MENEZES, I.C. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.72-76, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n.6772, p.853–858, 2000.

NAMLI, S.; AYAZ, E. Influence of different cytokinins used in *in vitro* culture on the stoma morphology of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.5, p.561-563, 2007.

NEGRELLE, R.R.B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.34, n.1, p.91-100, 2012.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.41, n.6, p.701-717, 2005.

NIBAU, C.; GIBBS, D.J.; COATES, J.C. Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. **New Phytologist**, v.179, n.3, p.595-614, 2008.

NICOLI, P. M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SANTANA, J. R. F.; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C.; PORTO, J. M. P. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.685-689, 2008.

NIEVOLA, C.C.; KRAUS, J.R.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C<sub>3</sub> photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.41, n.6, p.832-837, 2005.

OLIVEIRA, Y.; ANSELMINI, J.I.; CUQUEL, F.L.; PINTO, F.; QUOIRIN, M. Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi-ornamental. **Ciência e agrotecnologia**, v.34, n.spe, 2010 .

OLIVEIRA, M.K.T.; BEZERRA NETO, F.; CÂMARA, F.A.A.; NUNES, G.H.S.; OLIVEIRA, F.A. Propagação “*in vitro*” da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.167-171, 2007.

OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; CASTRO, E.M.; SANTANA, J.R.F.; NOGUEIRA, R.C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1447-1451, 2008.

OLIVEIRA, Y.; PINTO, F.; SILVA, A.L.L.; GUEDES, I.; BIASI, L.A.; QUOIRIN, M. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.192-197, 2010.

OSÓRIO, M.L.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* plants in response to different irradiances. **Biologia Plantarum**, v.54, n.3, p.415-422, 2010.

OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.3, p.438–446, 2007.

PAIVA, P.D.; NAVES, V.C.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Avaliação de diferentes formulações de sais minerais para a micropropagação de *Nidularium fulgens* LAM. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v.2, n.1, p.9-14, 2006.

PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* Hortus ex Beer a partir de ápices caulinares. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, v.42, n.4, p.491–505, 2008.

PASQUAL, M. **Introdução**: fundamentos básicos. In: Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV). Lavras:UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

PASQUAL, M.; SANTOS, F.C.; FIGUEIREDO, M.A.; JUNQUEIRA, K.P.; REZENDE, J.C.; FERREIRA, E.A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.1, p.45-49, 2008.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de bromélias**. 3 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 106p.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.234-239, 2001.

PERBONI, A.T.; CASSOL, D.; SILVA, F.S.P.; SILVA, D.M.; BACARIN, M.A. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of flooding in canola hybrids. **Biologia**, v.67, n.2, p.338-346, 2012.

PEREIRA, C.; CUQUEL, F.L.; PANOBIANCO, M. Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.36-41, 2010.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus* cf. *scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24 (Edição Especial), p.74-80, 2000.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CASTRO, D.M.; RODRIGUES, H.C.A.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de curauá propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v.29, n.1, p.23-28, 2007.

PERES, L.E.P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PICKENS, K.; WOLF, J.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.42, n.4, p.348–353, 2006.

PITA, P.B.; MENEZES, N.L. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.1, p.25-34, 2002.

POMPELLI, M.F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p.1-9, 2006.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M.P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, n.3, p.273-279, 2004.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.117-124, 2005.

POORNIMA, G.N.; RAVISHANKAR RAI, V. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.20, p.2348-2352, 2007

PROENÇA, S.L.; SAJO, M.G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.2, p.319-331, 2004.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. LISCHKA, R.W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v.14, n.8, p.1799-1808, 2005.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonni* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.821-827, 2008.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.; HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, n.6, p.1141-1153, 2009.

RIMA, J.A.H.; MARTIM, S.A.; DOBBSS, L.B.; EVARISTO, J.A.M.; RETAMA, C.A.; FAÇANHA, A.R.; CANELLAS, L.P. Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.614-620, 2011.

ROCHA, M.A.C.; COSTA, M.A.P.C.; SILVA, S.A.; LEDO, C.A.S.; MOREIRA, M.J.S.; BASTOS, L.P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.769-774, 2008.

RODRIGUES, I. M. C.; FERREIRA, F. A.; GROSSI, J. A. S.; BARBOSA, J. G.; PAULA, C. C.; REIS, M. R. Ocorrência de plantas daninhas no cultivo de bromélias. **Planta daninha**. v.25, n.4, p.727-733, 2007.

RODRIGUES, T.J.D.; LEITE, I.C. **Fisiologia vegetal**: hormônios das plantas. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2004. v.1. 78 p.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, v.616, p.439-442, 2003.

RUTA, C.; FORTUNATO, I.M. *In vitro* propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.46, n.2, p.172-179, 2010.

SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; SÁEZ, K.L.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M.I.; RÍOS, D.G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between *in vitro* and nursery plants. **Biologia Plantarum**, v.56, n.1, p.15-24, 2012.

SANDOVAL, J.A.; MÜLLER, L.E.; WEBERLING F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, v.49, n.1, p.37-46, 1994.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição Especial), p.70-84, 2000.

SANTOS, A.J.; BITTENCOURT, A.M.; NOGUEIRA, A.S. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral paranaense. **Floresta**, v.35, n.3, p.409-417, 2005.

SANTOS, H.A.; MELLO, S.C.M.; PEIXOTO, J.R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido-indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, v.26, n.6, p.966-972, 2010a.

SANTOS, D.S.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C.C. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.6, p.524-529, 2010b.

SCARANO, F.R.; DUARTE, H.M.; RÔÇAS, G.; BARRETO, S.M.B.; AMADO, E.F.; REINERT, F.; WENDT, T.; MANTOVANI, A.; LIMA H.R.P.; BARROS, C.F. Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tankbromeliad. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.140, n.4, p.391-401, 2002.

SCATENA, V.L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.3, p.635-649, 2005.

SCHANKER, G.; TÓTH, S.Z.; STRASSER, R.J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1706, n.3, p.250-261, 2005.

SEGECIN, S.; SCATENA, V.L. Anatomia de escapos de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.3, p.515-525, 2004.



SEON, J.; CUI, Y.; KOZAI, T.; PAEK, K. Influence of *in vitro* growth on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, n.2, p.171–17, 2000.

SILVA, A.L.L.; BISOGNIN, D.A.; BARRIQUELLO, C.J.; RITTER, C.E.L. Germinação *in vitro* de sementes de mogango (*Cucurbita pepo* L.) - Cucurbitaceae. **Ciência e Natura**, v.27, n.1, p.19-28, 2005.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; BORTOLI, C.L.R.; MARGUERITE, Q. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (*Bromeliaceae*). **Iheringia**, v.64, n.2, p.151-156, 2009.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; GESING, J.P.A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia**, v.63, n.1, p.135-138, 2008a.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.M.; BRAGA, F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, v.33, n.11, p.839-843, 2008b.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.923-932, 2009.

SOUZA, G.M.; ESTELITA, M.E.M.; WANDERLEY, M.G.L. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, Bromelioideae-Bromelioideae. **Revista Brasileira Botânica**, v.28, n.3, p.603-613, 2005.

SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira –M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.161-164, 2007.

SOUZA, D.S.; SIQUEIRA, D.L.; CECON, P. R.; SANTOS, D. Micropropagação das bananeiras 'Prata-Anã' e 'FHIA 01' a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.32, n.2, p.561-570, 2010.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, n.5, p.450-454, 2003.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. **Measuring fast fluorescence transients to address environ-mental questions**: the JIP-test. In: Mathis P, editor. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 977–80.

STRASSER R. J.; TSIMILLI-MICHAEL M. Stress in plants, from daily rhythm to global changes, detected and quantified by the JIP-test. **Chimie Nouvelle** (SRC), v.75, p.3321–3326, 2001.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE, (Eds.), **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p.321-362, 2004.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1797, n.6, p.1313-1326, 2010.

STRINGHETA, A.C.O.; SILVA, D.J.H.; CARDOSO, A.A.; FONTES, L.E.F.; BARBOSA, J.G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.27, n.1, p.165-170, 2005.

SWAIN, S.S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P.K.; CHAND, P.K. Photosynthetic and transpiration responses of in vitro-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.134–141, 2010.

THACH, L.B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v.94, n.2, p.423-436, 2007.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p.311-336.

TOMEK, P.; LAZÁR, D.; ILÍK, P; NAUS, J. On intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measure at different intensities of exciting light. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, n.11, p.115-1160, 2001.

TÓTH, S.Z.; SCHANKER, G.; STRASSER, R.J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. **Photosynthesis Research**, v.93, n.1, p.193-203, 2007.

ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; BRITO, J.C. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.1, p.11-18, 2010.

VESCO, L.L.D.; STEFENON, V.M.; WELTER, L.J.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.28, n.4, p.515-522, 2011.

VOLTOLINI, C.H.; SANTOS, M. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.2-10, 2011.

VREDENBERG, W.J. A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in Photosystem II incorporating radical pair recombinations. **Biophysical Journal**, v.79, n.1, p.25-38, 2000.

WANG, H.; WANG, F.L.; WANG, G.; MAJOURHAT, K. The responses of photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of nectarine (*Prunus persica* var. *Nectarina* Maxim) to greenhouse and field grown conditions. **Scientia Horticulturae**, v.112, n.1, p.66–72, 2007.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.18, p.10487-10492, 2001.

YAN, H.; LIANG, C.; YANG, L.; LI, Y. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.1, p.115-120, 2010.

YANG, S.H.; YEH, D.M. *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, n.2, p.201-207, 2008.

YUSUF, M.M.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, N.B.; SARIN. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1797, n.8, p.1428-1438, 2010.

ZHU, X.G.; GOVINDJEE, R.; BAKER, N.R.; deSTURLER, E.; ORT, D.R.; LONG, S.P. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. **Planta**, v.223, n.1, p.114–133, 2005.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S.R. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. Paluma e Século XXI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.31-36, 2007.